

**Physikalisch-chemische und biologische Untersuchungen
an 2-Aminoacridin und ausgewählten Derivaten**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Albert-Ludwigs-Universität
zu Freiburg i. Br.

vorgelegt von
Helmut G. Unger
aus Öhringen/Hohenlohekreis

1977

**Physikalisch-chemische und biologische Untersuchungen
an 2-Aminoacridin und ausgewählten Derivaten**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Albert-Ludwigs-Universität
zu Freiburg i. Br.

vorgelegt von
Helmut G. Unger
aus Öhringen/Hohenlohekreis
1977



Dekan: Prof. Dr.rer.nat. Chr. Rüchardt
Leiter der Arbeit: Prof. Dr.rer.nat. H. Zimmermann,
Prof. Dr.med. D. Wittekind
Referent: Prof. Dr.rer.nat. H. Zimmermann
Korreferent: *Prof. Dr. med. D. Wittekind*

Tag der Bekanntgabe des Prüfungsergebnisses: 15 12 77

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und zu gleichen Teilen unter der Leitung der Herren Professoren Dr.rer.nat. H. Zimmermann und Dr.med. D. Wittekind in der Zeit vom Frühjahr 1972 bis September 1976 am Anatomischen Institut und als Meßgast am Physikalisch-chemischen Institut der Universität Freiburg durchgeführt.

Da beide Hochschullehrer jeweils gleichgewichtig den physikalisch-chemischen sowie biologischen Teil dieser interdisziplinären Arbeit geleitet haben, habe ich mir erlaubt, sie bei der umseitigen Benennung der Leitung zugleich aufzuführen. Meinen beiden hochverehrten Lehrern danke ich aufrichtig für die nie versagende Anteilnahme an meiner Arbeit. Sie haben auch in einer für mich persönlich äußerst schwierigen Zwischenphase die Gewißheit vermittelt, daß ich auf Interesse und Förderung bauen durfte. U. a. war die Zuteilung eines GFG-Stipendiums der Universität Freiburg, an welcher beide Betreuer einen wesentlichen Anteil tragen, eine Hilfe, die ich nicht vergessen werde.

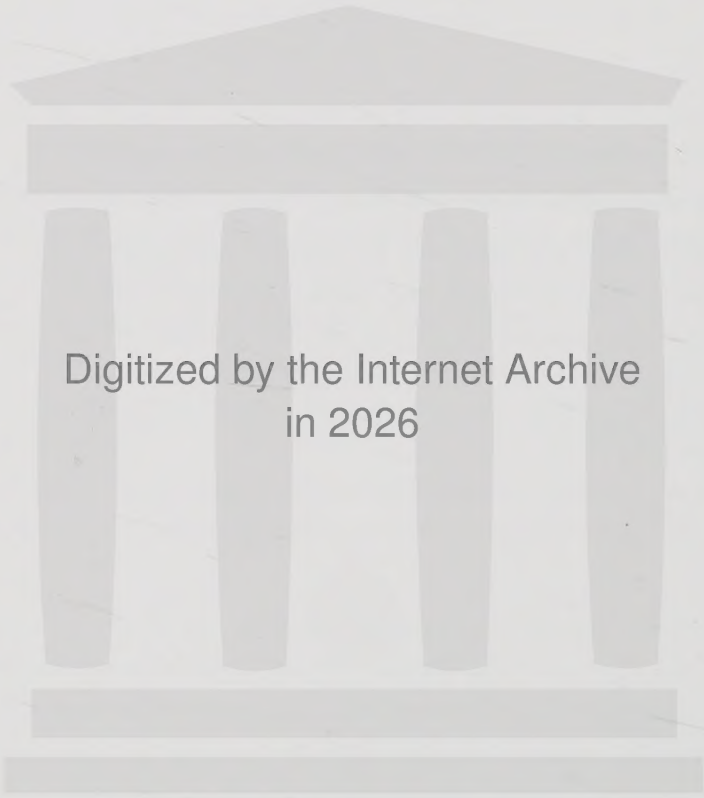
Außerdem möchte ich mich bei jetzigen und früheren Mitarbeitern von Prof. Zimmermann bedanken: Bei Herrn Dr. W. Seiffert für viele wichtige Diskussionen, bei den Herren Dr. Ingfried Zimmermann (jetzt Berlin) und Dr. Dirk Bergmann (jetzt Karlsruhe) für grundsätzliche Diskussionen und sachkundige Hilfe bei nötigen Messungen.

Dem mikroanalytischen Labor des Instituts für makromolekulare Chemie danke ich für die Ausführung zahlreicher Mikroanalysen.

Dem Rechenzentrum der Universität danke ich für die Überlassung notwendiger Rechenzeit und kritischer Programmberatung.

Dem Mitarbeiterkreis von Prof. Wittekind, insbesondere Frä. Sohmer, Frä. Kretschmer und Herrn Horn bin ich für kritische Diskussionen und Hilfen bei der Laborarbeit zu Dank verpflichtet. Der Photoabteilung des Anatomischen Institutes danke ich für zahlreiche wichtige Photographien.

Meinen Eltern



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545307_0018

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I Einleitung	1
II Problemstellung	4
III Bemerkungen zur Problemstellung	6
 1. Teil Chemische Synthesen und physikalisch-chemische Untersuchungen	 11
1.1 Allgemeine Synthesemethoden für die Acridinderi- vate dieser Arbeit	11
1.2 Spektroskopische Untersuchungen	16
1.2.1 Allgemeine Regeln	16
1.2.2 Messung der Polarisaton der Banden	16
1.3 Quantenchemische Modellrechnungen. Die PPP-Methode, ihre semiempirischen Parameter	18
1.4 Meßergebnisse und Auswertung	26
1.4.1 Messungen bei Tieftemperatur	26
1.4.1.1 Beschreibung der Elektronenspektren	26
1.4.1.2 Die Spektren der Monoaminoacridinderivate	26
1.4.1.3 Die Spektren der Diaminoacridinderivate	34
1.4.2 Diskussion der Spektren mit Hilfe quantenchemi- scher Rechnungen nach der PPP-Methode	40
1.4.2.1 Einleitung	40
1.4.2.2 SCF-CI-Rechnungen an Monoaminoacridinverbindungen	41
1.4.2.3 SCF-CI-Rechnungen an Diaminoacridinverbindungen	49
1.4.3 Spektrophotometrie bei Normaltemperatur	56
1.4.3.1 Zur Frage des Ortes der Protonierung des Acridins und seiner Aminoderivate	56
1.4.3.2 Messung der pK_s -Werte, Zuordnung zu den basischen Zentren der Verbindungen	59
1.4.3.3 Zur Frage der Solvatochromie und Metachromasie der Verbindungen	62

	Seite
2. Teil Biologische Untersuchungen	67
2.1. Einleitung	67
2.2 Cytologische Untersuchungen	67
2.2.1 Kontrollkulturen	67
2.2.2 Vital gefärbte Fibroblasten	68
2.2.2.1 Befunde mit einzelnen Fluorochromen - 2-Aminoacridin	69
2.2.2.2 2,7-Diaminoacridin	70
2.2.2.3 2-Amino-7,9-dimethylacridin	70
2.2.2.4 2-Amino-7-methoxy-9-methylacridin	75
2.2.2.5 2,7-Diamino-9-methylacridin	76
2.2.2.6 Beobachtungen zur Vitalfluorochromierung durch 2-Amino-9-methylacridin	78
2.2.2.7 Fixation und Beurteilung vitalfluorochromierter Zellen unter Strukturhaltung und Verlust der Fluoreszenz	79
2.2.3 Fluoreszenzfärbungen an unvorbehandelten, in Kultur gewachsenen, fixierten HeLa-Zellen und Mäusefibroblasten	82
2.2.3.1 Einleitung und Ergebnisse	82
2.2.3.2 Diskussion der Ergebnisse	85
2.3 Fluoreszenzfärbungen an ausgewählten Organ- präparaten	88
2.3.1 Einleitung	88
2.3.2 Befunde mit einzelnen Fluorochromen - 2,7-Diaminoacridin	88
2.3.3 2-Amino-7,9-dimethylacridin	89
2.3.4 2-Amino-7-methoxy-9-methylacridin	90
2.3.5 2,7-Diamino-9-methylacridin	91
2.4 Diskussion aller Resultate aus Vitalfluorochro- mierung und Fluorochromierung fixierter Zellen und Gewebe	92

	Seite
3.	Praktischer Teil 96
3.1	Arbeitsvorschriften zu den chemischen Synthesen und spektroskopischen Messungen 96
3.1.1	Messung der Fluoreszenz und der Polarisation von Absorption und Fluoreszenz 96
3.1.2	Bereitung der Lösungen 98
3.2	Arbeitsvorschriften für die chemischen Synthesen 99
3.2.1	2-Chlor-5-nitroacetophenon und 2-Chlor-5-nitrobenzoesäure 99
3.2.2	2-Aminoacridin 99
3.2.3	2,7-Diaminoacridin 100
3.2.4	Die 9-Methylsubstituierten Verbindungen 101
3.2.4.1	2-Amino-7-methoxy-9-methylacridin 101
3.2.4.2	2-Amino-7,9-dimethylacridin 103
3.2.4.3	2,7-Diamino-9-methylacridin 104
3.3	Dünnschichtchromatographische Charakterisierung der Verbindungen 105
3.4	Erläuterungen zum quantenchemischen Rechenprogramm 105
3.5	Biologische Untersuchungen, Material und Methoden 106
3.5.1	Cytologisches Untersuchungsmaterial 106
3.5.1.1	Vitalfluorochromierung 106
3.5.1.2	Fluorochromierung fixierter Zellen 106
3.5.1.3	Fixation vitalfluorochromierter Zellen 106
3.5.2	Histologisches Untersuchungsmaterial 107
4.	Zusammenfassung 108
5.	Literaturverzeichnis 110
6.	Lebenslauf 118

I. Einleitung

Nehmen lebende Zellen Substanzen auf, so reagieren sie mit diesen in einer Weise, die sowohl von der Art und dem Zustand, den biologischen Eigenschaften, der Zellen abhängt als auch von den chemischen Eigenschaften der aufgenommenen Substanzen bestimmt wird.

Dieser Vorgang wird als Vitalfärbung bezeichnet, wenn die aufgenommene Substanz ein Farbstoff (Fs) ist.

Ist nun die aufgenommene Substanz zu Fluoreszenz befähigt, wird dieser Vorgang als vitale Fluoreszenzfärbung oder Vitalfluorochromierung bezeichnet.

Die Zellforschung in jüngerer Zeit hat sich bei Untersuchungen an vitalen Zellen wieder verstärkt der Technik der Vitalfluorochromierung zugewandt. Die bevorzugten Fluoreszenzfarbstoffe (FFs) bei diesen Untersuchungen sind Abkömmlinge des Acridins. Unter diesen Stoffen ist den 3,6-disubstituierten Derivaten (IUPAC-Zählung 28,42,84,102) Acridinorange, 3,6-Bis(dimethylamino)acridin, abgekürzt AO und Proflavin, 3,6-Diaminoacridin = 3,6-DiAA, besonderes Interesse zuteil geworden. Die Bedeutung des AO für die Vitalfluorochromierung geht bereits auf Beobachtungen von Bukatsch und Haitinger (15) sowie von Strugger zurück (104).

Zum einen wird dies heute auf seine hohe Fluoreszenzausbeute zurückgeführt. Zum anderen besitzt es die färbetechnisch bedeutsame Eigenschaft, mit steigender Konzentration als Monokation zu assoziieren. Das Fluoreszenzmaximum wird dabei langwellig verschoben, (sog. bathochrome Verschiebung oder Rotverschiebung). Dieser Farbwechsel - Metachromasie - kann sowohl in Lösungen des Fs-kations als auch bei Zugabe von Chromotropen (Scheibe und Zanker, 127, 128) in vitro oder in Zellen und Geweben beobachtet werden. Als Chromotrope werden in diesem Zusammenhang natürliche (damit auch in vitalen oder fixierten Zellen intrazelluläre) und synthetische Polyanionen verstanden.

Schließlich stellt AO - auch dies ist für biologische Untersuchungen, bei welchen oft erhebliche Mengen an Fs benötigt werden, von Bedeutung - ein leicht zu erwerbendes Industrieprodukt dar (insb. 130).

Andere Acridinverbindungen wie Quinacrin (Atebrin^R) und Coriphosphin sind ebenfalls im Handel erhältlich, weisen aber mehr Verunreinigungen auf.

Atebrin als Fluorochrom ist durch Witte (117) und besonders durch die grundlegenden Arbeiten von Caspersson (17) wieder stark in das Interesse gerückt worden. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse von Chromosomen fixierter Zellen hat durch diese Verbindung eine erhebliche Bereicherung erfahren (93,115).

Verbindungen wie 9-Aminoacridin (9-AA) sind jedoch trotz hoher Fluoreszenzausbeuten und möglicher antibiotischer Qualitäten (Albert,1) als Fluorochrom nahezu unbekannt geblieben.

Auf die Fluoreszenzeigenschaften von Aminoacridinen, die in Stellung 2,7 oder/und 9 (tri)substituiert sind, haben in jüngerer Zeit D. Wittekind und J. Kunze (119,123) aufmerksam gemacht. Die Bedeutung, die nach den genannten Autoren dem 2-Aminoacridin (2-AA) und seinen 7- und 9-substituierten Derivaten zukommt, beruht auf der Beobachtung, daß Substitution in den genannten Stellungen durch Methyl-, Methoxy- und Aminogruppen zu Verbindungen führt, welche einerseits bei verschiedenen pH-Werten cytoplasmatische Areale in fixierten und lebenden Zellen mit einer grüngelben bis rotorangen Fluoreszenzfarbe versehen, andererseits Kernareale über einen weiten pH-Bereich gleichbleibend rotorange fluorochromieren.

Zumindestbisher ist diese Beobachtung bei cytologischen Untersuchung von keiner anderen Gruppe von Acridinverbindungen erzielt worden.

Auf diese Tatsache ist entschieden hinzuweisen, weil bis in die jüngste Zeit nur sehr wenige Fluoreszenzfarbstoffe bekannt sind, die den lebenden Zellkern (!) zu fluorochromieren gestatten.

De Bruijn et al. (59) haben in ihrer Arbeit in der Mehrzahl Verbindungen untersucht, die als Glieder der Familie der Acridinderivate Abkömmlinge mit Substituenten in den Stellungen 3 und 6 darstellen.

Die Arbeiten der letzten Jahre von D. Wittekind (119-123) über die Derivate des 2-AA haben gezeigt, daß die Möglichkeit, vitale Zellkerne zu fluorochromieren nicht auf 3,6-disubstituierte Acridinderivate beschränkt bleiben muß.

Es liegt Grund zu der Annahme vor, daß in diesen Untersuchungen eine neue, biologisch interessante Klasse von bis jetzt wenig beachteten Fluoreszenzfarbstoffen aufgefunden worden ist. Darüber soll im folgenden berichtet werden.

II. Problemstellung

Sinn dieser Arbeit ist es, die zitierten Studien über Derivate des 2-Aminoacridins fortzusetzen. Es soll versucht werden, den Mechanismus der Fluoreszenzfärbung vitaler und fixierter Zellen und Gewebe durch diese Verbindungen aufzuheilen.

Ausgehend von der Vorstellung, daß die Kenntnis physikalisch-chemischer Eigenschaften eines Farbstoffes die Interpretation von biologischen Experimenten mit diesem Fs erleichtert, wurden die physikalisch-chemischen und biologischen Untersuchungen dieser Arbeit durchgeführt.

Hierfür wurden folgende Substanzen synthetisiert, mit den Originalsubstanzen aus den Untersuchungen von D. Wittekind verglichen, mit physikalisch-chemischen Methoden charakterisiert und in biologischen Experimenten an lebenden und fixierten Zellen und Geweben beobachtet:

2-Aminoacridin (2-AA)

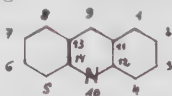
2-Amino-7,9-dimethylacridin (2-A-7,9-DiMeA)

2-Amino-7-methoxy-9-methylacridin (2-A-7-Met-9-MeA)

2,7-Diaminoacridin (2,7-DiAA)

2,7-Diamino-9-methylacridin (2,7-DiA-9-MeA)

Der Nomenklatur liegt die IUPAC-Zählweise zugrunde (28,42,84, 102):



Im ersten - chemischen - Teil der Arbeit werden die Synthesen dieser Verbindungen beschrieben. Sie lehnen sich an Literaturvorschläge an. Soweit jedoch Synthesewege unbekannt waren oder sich ältere Arbeitsvorschriften als nicht praktikabel erwiesen hätten, wurden eigene Wege erarbeitet.

Die spektroskopischen Untersuchungen erfolgten bei tiefer und normaler Temperatur. Bei Tieftemperatur wurden die Absorptions- (A-), Fluoreszenz- (F-), Absorptionpolarisations- (APF-) und Fluoreszenzpolarisationsspektren (FP) gemessen.

Diese Spektren sollten anhand semiempirischer, quantenchemischer Rechnungen nach der Methode von Pariser, Parr und Pople ("PPP-Methode") diskutiert werden (70,71).

Auf diesem Wege sollte ein Beitrag zur Klärung der Elektronenstruktur dieser Verbindungen geliefert werden.

Bei Normaltemperatur waren die Säure-Base-Eigenschaften dieser Verbindungen zu bestimmen: Einerseits mußten die Orte der Protonierungen in diesen Molekülen bestimmt werden. Andererseits sollten die vor allem biologisch relevanten pK_s -Werte gemessen werden.

Eine erste, orientierende Untersuchung zur Frage der Solvatochromie und Metachromasie dieser Verbindungen - auch in Gegenwart von Chromotropen - sollte den gegenwärtigen Stand der Untersuchungen abschließen.

Der zweite - biologische - Teil der Arbeit hatte sich mit den Ergebnissen aus Fluorochromierungsversuchen an lebenden und fixierten Zellen und Geweben zu befassen: In Kenntnis ihrer physiko-chemischen Eigenschaften sollte die Wechselwirkung dieser Fluorochrome mit verschiedenen intrazellulären Substraten mikroskopisch beobachtet und beurteilt werden. Als Methoden kamen die Hellfeld-, Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie zur Anwendung.

Zu Beginn des vorliegenden Berichtes wird deshalb ein kurzer, kritischer Abriß der Faktoren gegeben, welche bei der Fluorochromierung lebender und fixierter zellulärer Substrate vorrangige Bedeutung besitzen. Er soll versuchen, die Intentionen wiederzuspiegeln, die für die Zusammenarbeit zwischen physikalischer Chemie und Zellforschung in der vorliegenden Arbeit charakteristisch sind.

III. Zur Notwendigkeit und zu den Ursachen der Anfärbung
biologischer Substrate durch Farbstoffe oder Fluorochrome.
Bemerkungen zur Problemstellung

Es lassen sich in der Literatur der letzten hundert Jahre zahlreiche ausgezeichnete Arbeiten finden, welche hierzu fundiert Stellung beziehen und naturgemäß für diese Arbeit wichtige Gedanken abhandeln (7,16,23,29,35,60,91,95,114,118). Ungefärbte lebende oder fixierte Zellen bzw. intrazelluläre Substrate weisen - von den hier nicht zu behandelnden pigmenthaltigen Zellen abgesehen - nicht die Fähigkeit auf, im sichtbaren Teil des Spektrums wesentlich Anteile des eingestrahltten Lichtes zu absorbieren. Im Hellfeldmikroskop kann daher das menschliche Auge nur wenige, besonders dichte, ungefärbte Zellstrukturen als kontrastreich differenzieren. Sinn jeder mikroskopischen Technik ist es deshalb, Kontraste für das menschliche Auge zu entwickeln, die vitalen oder fixierten Strukturen äquivalent sind oder direkt entsprechen und somit gesetzmäßig beobachtbar werden (F. Nissl, 64).

In der Phasenkontrastmikroskopie werden auf physikalisch-technische Weise Kontraste erzeugt, ohne zunächst einen färbetechnisch notwendigen Eingriff in die Zelle oder das sie umgebende Medium vornehmen zu müssen: Jede Zellstruktur ändert über ihren Brechungsindex die Phase einer sie durchdringenden Lichtwelle gegenüber der Umgebung. Die den verschiedenen Strukturen zuzuordnenden Phasendifferenzen werden durch einen Eingriff in den Strahlengang am Mikroskop in einen für das Auge wahrnehmbaren Kontrast - meist Hell-Dunkel der Schwarz-Weiß-Skala - umgewandelt (107,118).

Im Gegensatz dazu wird notwendigerweise in die Zelle eingegriffen, wenn Kontraste dadurch entstehen, daß ein Anfärben intrazellulärer Substrate verschiedene Farbwerte an unterschiedlichen Orten der Zelle erzeugt. Das Ergebnis dieses "Eingriffes" wird nun im Hellfeld- oder Fluoreszenzmikroskop beobachtbar. Es hängt wesentlich von folgenden Faktoren ab:

- A) Äußere physikalisch-chemische Parameter, die die Wechselwirkung zwischen Fs und zellulärem Substrat bestimmen.
- B) Physikalisch-chemische Eigenschaften des Fs.
- C) Chemische und biologische Eigenschaften des zellulären Substrates.

Zu den physikalisch-chemischen Parametern, welche die Färbungsreaktion beeinflussen, zählen: Temperatur, Zeitdauer der Färbung, Konzentration der Reaktanten, pH-Wert des Mediums, Zusammensetzung des Mediums, in welchem gefärbt oder fluorochromiert wird. Man muß naturgemäß unterscheiden, ob vitale oder fixierte Zellen Gegenstand der Untersuchung sind ("Begleitumstände").

Bei der Vitalfärbung sind die Bedingungen im Färbemedium, der Incubationslösung, durch die Forderung nach physiologischem Milieu äußeren Eingriffen weitgehend entzogen vorgegeben: Die Temperatur soll (möglichst) 37°C betragen, der pH-Wert muß im physiologischen Bereich liegen, die Incubation hat steril zu erfolgen, wenn längere Expositionszeiten erforderlich sind. Im Bezug auf die Konzentration und Dauer der Einwirkung des Fs auf die lebende Zelle muß die Toxizitätsschwelle des Fs beachtet werden, wenn nicht besonders cytotoxische Effekte des Fs geprüft werden sollen.

Bei der Fluorochromierung fixierter Zellen oder Gewebe hingegen sind die genannten Parameter mit Ausnahme der pK_{S} -Werte der Fs in einem Färbepufferbad zunächst beliebig wählbar. Je nach Fragestellung können diese Größen von Fall zu Fall ausgesucht werden. Auf die folgenden Techniken wird deshalb nur in Stichworten hingewiesen: Progressive Färbung, regressive Färbung, Succedanfärbung, Simultanfärbung (16,23,35,85).

Chemische und physikalisch-chemische Eigenschaften eines Fs sind u.a.: Räumliche Struktur bzw. Konformation, Molekulargewicht, Ladungsverteilungen, Polarisierbarkeiten und pK_{S} -Werte. Der (oder bei mehreren möglichen die) pK_{S} -Werte des Fs und der vorgegebene pH des Mediums bestimmen die Konzentrationsverhältnisse verschiedener Protonierungsstufen des Fs entsprechend einem allgemeinen Säure-Base-Gleichgewicht (Gl.1),



"Fs-base"

"Fs-kation-säure"

allgem. (n-1.)te Protonierungs-
stufe

n.te Protonierungsstufe

welches auch für die hier untersuchten Acridinderivate selbstverständlich gültig ist.

Außerdem ist ein Fs durch mindestens eine der folgenden wichtigen Eigenschaften gekennzeichnet: Solvatochromie, Orthochromasie oder Metachromasie. Die Diskussion vor allem des Solvatochromiebegriffes ist zur Zeit noch nicht entgültig abgeschlossen (47,48,49,52,53,66,94). Folgende Definition findet in dieser Arbeit Verwendung: Unter Solvatochromie versteht man eine Verschiebung der Banden des Spektrums eines Fs bei Änderung seiner Solvathülle in verschiedenen Lösungsmitteln. Es können also intrazelluläre Farbkontraste mit jenen Fluoreszenzfarbstoffen erzielt werden, die spektroskopisch empfindlich auf eine Änderung ihrer Solvathülle nach Bindung an verschiedenen intrazelluläre Substrate reagieren. Ändert sich nun die Farbe beim "Aufziehen" eines Fs auf das Substrat nicht, entspricht daher das Spektrum nach der Färbung dem der monomeren Spezies des Fs, ist die Färbung (wie meist näherungsweise) orthochromatisch. Hierbei kann die Solvatochromie so geringe Beträge annehmen, daß sie dem mikroskopischen Beobachter zunächst entgeht und nur bei sorgfältiger spektroskopischer Messung erfaßt wird (52,53,66). Folglich entstehen orthochromatische Kontraste durch quantitativ unterschiedliche Fs-Bindung an zelluläre Substrate, welche nach Helligkeit (Leuchtdichte), Farbton (farbengleiche Wellenlänge) und verschiedenem Sättigungsgrad (spektraler Anteil) differenziert werden (IBK-System 133, S.141).

Schließlich wird bei verschiedenen Fs mit steigender Konzentration eine Assoziation zu Oligo- und Polymeren des Fs-kations beobachtet. Dies geht mit Veränderungen der Banden im Spektrum einher und wird als Metachromasie gekennzeichnet. Begünstigt wird diese Assoziation u.a. auch durch die intrazellulären Chromotrope, deren unterschiedliche Verteilung in der Zelle

somit ebenfalls Anlaß zur Entstehung von Kontrasten gibt.

Unabhängig von möglichen äußeren Eingriffen sind in einer vitalen Zelle folgende biologische Faktoren in ihrer Vitalität selbst festgelegt:

- a) Der intrazelluläre pH und damit der Zustand des Lösungsmittels Wasser durch den gegebenen metabolischen Zustand der Zelle, bei dessen Beschreibung mithilfe des Begriffes "Phosphorylierungspotential" oder "Energieladung" der Zelle (Atkinson, 4) ein Hauptaspekt - vielleicht der wichtigste - der Zellvitalität genannt werden kann.
- b) Die elektrische Gesamtladung der Chromotrope, welche korrespondierend zu ihren pK_s -Werten Einfluß auf das Gleichgewicht Gl.1 ausüben.
- c) Die Ladung der Proteine entsprechend ihrem isoelektrischen Punkt (IEP).

Im vitalen Zustand bleibt somit aus prinzipiellen Gründen die Konformation der Biopolymeren unbekannt. Die Exposition des Fs erfolgt gleichwohl durch Begleitumstände in gesetzmäßiger Weise, jedoch antwortet eine lebende Zelle darauf stets individuell. Der Fs erfüllt damit aber auch die Definition eines Pharmakons (50, 116).

Erst wenn die Zelle durch Fixation devitalisiert worden ist, kann anhand der fixiert erhaltenen Äquivalentstruktur in einer Weise vorgegangen werden, daß einerseits begrenzte Aussagen über die Konformation (M. Perutz, 74) und elektrischen Ladungen von Biopolymeren getroffen werden können und andererseits die elektrischen Ladungen dieser Substrate über den pH des Färbades gesteuert werden können. Somit kann die Färbung entsprechend Gl.1 wesentlich durch äußere Eingriffe gesetzmäßig beeinflußt werden, sodaß sie dann im Hellfeld oder Phasenkontrastmikroskop beobachtet werden kann.

Der bis heute anhaltende Erfolg der bekannten Farbstoffe AO und Methylenblau und seiner Azurderivate bei der Färbung vitaler oder fixierter Zellen steht einerseits mit deren bestimmten physikalisch-chemischen Eigenschaften in Zusammenhang, andererseits basiert er auf der Tatsache, daß die unter dem zunächst

sehr weit gefaßten Begriff "Begleitumstände" subsummierten, unter A und B diskutierten Größen in strenge (histochemische) Arbeitsvorschriften eingearbeitet sind, welche gesetzmäßige Ergebnisse bei Färbungen auftreten lassen: Ihrer chemischen Natur nach sind diese Anthrazenheterozyklen starke Basen. Ihre 1. pK_s -Werte liegen ausnahmslos über 10 ($20^{\circ}C$). Die 2. und 3. Protonierungsstufen liegen in stark sauren, physiologisch bedeutungslosen pH-Bereichen. Im intrazellulären Milieu, pH 7,2 - 7,4 (24,100), sowie bei in der Zellfärbung gebräuchlichen pH-Werten zwischen 3 und 9 werden nur Monokationen beobachtet. Nach reversibler Assoziation zeigt z.B. AO im Fluoreszenzbild Kontraste, die von orthochromatisch färbenden Kationmonomeren und metachromatisch aktiven Kationpolymeren im Färbegleichgewicht ausgelöst werden.

Um Indikatoreigenschaften im Sinne der Chemie wässriger Lösungsmittel aufzuweisen, sollten Fluorochrome hingegen orthochromatische, pH-abhängige Kontraste erzeugen (7,9,35,134):

1. Wie aus Gl.1 abzuleiten ist, sollte der pK -Wert eines Fluorochromes im Bereich des pH (näherungsweise ± 1 pH-Einheit) liegen, in welchem die Schwankungen des intrazellulären pH erwartet werden können.
2. Farbbasen zeigen regelmäßig (Förster,27) keine Fähigkeit zur Assoziatbildung. Wenn protonierte Fs diese Eigenschaft nicht erkennen lassen, (z.B. einige Triphenylmethanfarbstoffe) so ist die Ursache hierfür in der chemischen Struktur dieser Stoffe zu suchen. Dabei können die verschiedenen Dissoziationsstufen des Fs durchaus eine Solvatochromie aufweisen.
3. Kann nun die Änderung der Extinktion beim Gang von einer zur anderen Protonierungsstufe genügend rasch erfolgen (Farbumschlag), darf der Substanz eine Indikatoreigenschaft im genannten Sinne zuerkannt werden. Läßt sich dieser Farbumschlag auch bei der Fluoreszenz einer Verbindung beobachten, liegt ein Fluoreszenzindikator vor. Eine vitale oder fixierte Zelle ist bei dem entsprechenden pH gleichsam mikroskopisch beobachtbar gefärbt und im chemischen Sinne "mikroanalytisch" titriert worden.

Die Untersuchungen an den Verbindungen dieser Arbeit sind vor allem durch diese zuletzt dargestellten Gedanken angeregt worden.

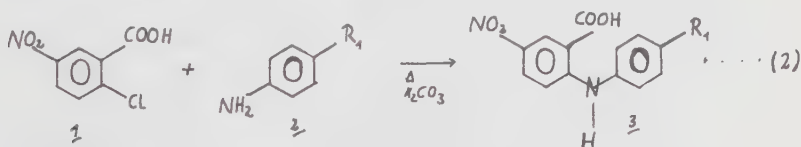
1. TEIL: CHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN

1.1. Allgemeine Synthesemethoden für Acridinderivate

Der Literatur kann man entnehmen, daß 3- und 6-mono- oder disubstituierte Derivate des AcridinGrundkörpers wesentlich leichter zugänglich sind als Derivate in 2- und 7-Stellung. Die Substitution in 9-Stellung nimmt vergleichsweise eine gewisse Sonderstellung ein. Aus diesem Grund haben AO und 3,6-DiAA industrielles Interesse geweckt, wohingegen die Derivate, die in 2,7- und 9-Stellung trisubstituiert sind, bisher nicht industriell produziert worden sind (1,3,130).

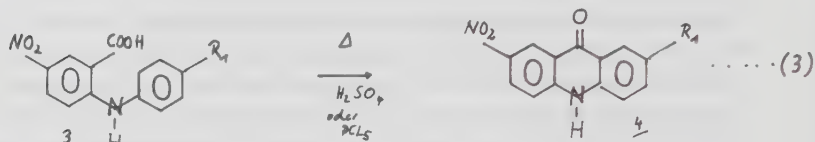
Es existieren durchaus Literaturvorschriften, die eine Substitution aller möglichen Positionen des AcridinGrundkörpers beschreiben. Nach diesen Angaben jedoch ist es aus mechanistischen Gründen verschiedentlich geboten, bestimmte zusätzliche Substituenten mitzuführen, um überhaupt eine Synthese zu ermöglichen. Ein Beispiel ist die Synthese des von uns gewünschten 2-Amino-7-methoxy-9-methylacridins (2-A-7-Met-9-MeA). Literaturangaben sind bis heute nur zu einem 3-Chlor-homologen aufzufinden. (88)⁺

2,7-Disubstituierte Acridinverbindungen sind durch Umsetzung eines Nitrobenzoesäurederivates 1 mit parasubstituierten Anilinderivaten 2 erhältlich, Gleichungen 2-4, $R_1 = H, NO_2$.



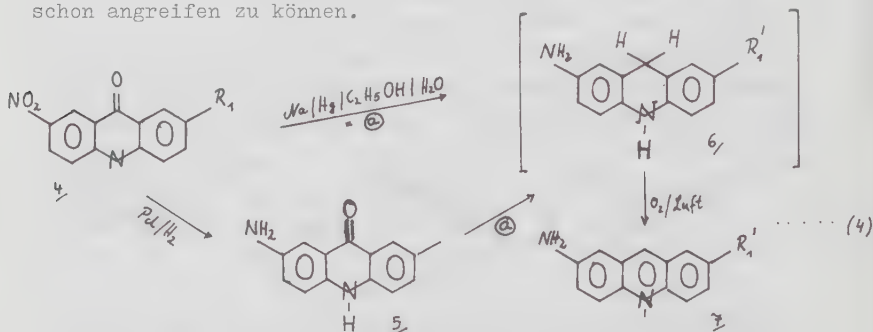
⁺ Die von uns gewünschte Verbindung 2-A-7-Met-9-MeA stand aus der Privatsammlung von D. Wittekind als (originale) Vergleichssubstanz zur Verfügung. Der Autor dieser Verbindung hat jedoch die Synthese nicht veröffentlicht (Persönliche Mitteilung von D. Wittekind, 124).

Aus 1 und 2 läßt sich das Diphenylamincarbonsäurederivat 3 synthetisieren. Diese Carbonsäure wird gemäß Gleichung 3 zu den Nitroacridanonderivat 4 zyklisiert. Diese Acridanone sind als Vorstufen zum Acridinderivat 7 aufzufassen (7,12).



Aus präparativen Gründen ist die Zyklisierung mit Schwefelsäure der mit PCl_5 vorzuziehen (11,31,43). Schließlich erhält man die 2,7-mono- oder disubstituierten Acridinderivate 7 durch Reduktion von 4. $\text{R}_1 = \text{H}$ führt zu 2-AA. $\text{R}_1 = \text{NO}_2$ führt zu 2,7-DiAA.

Sind außerdem noch die möglichen Zwischenstufen 5, Aminoacridanone, erwünscht, empfiehlt es sich, 4 zu 5 katalytisch zu reduzieren. Nach Schröter (97) reicht das Redoxpotential des Wasserstoffes am Pd-katalysator in methanolischer Lösung aus, die Nitrogruppe (n) zu reduzieren, ohne die Ketongruppe schon angreifen zu können.



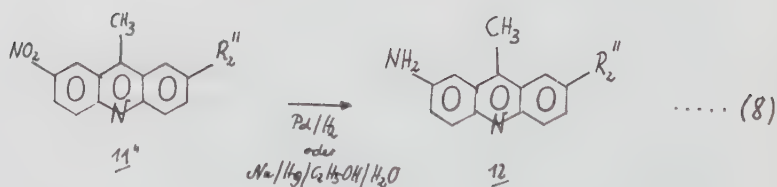
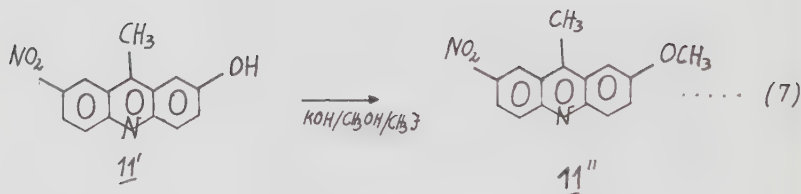
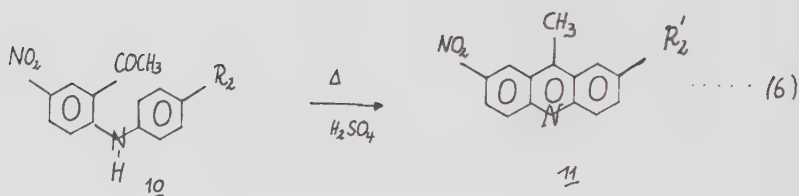
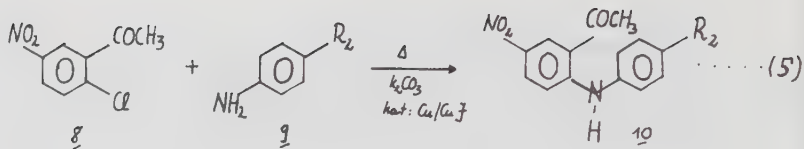
Im Gegensatz dazu ist die Reduktion der Ketonfunktion im System Na/Amalgam/Alkohol/Wasser möglich. Nitro- und Ketongruppe werden in einem Reaktionsschritt reduziert, aus 4 entsteht über 6 das Derivat 7. Um also den Umweg von 4 nach 5 ebenfalls mit der Synthese von 7 beenden zu können, muß die Reduktion mit Na-Amalgam auf dem Wege 5 nach 6 zusätzlich durchgeführt werden.

Gemeinsames Endprodukt dieser Reduktionen ist das Aminoacridan-derivat 6, $R_1' = H, NH_2$. Es ist oxidationsempfindlich und wird bei den vorliegenden Reaktionsbedingungen bereits durch Luft-sauerstoff zur Aminoacridinverbindung 7 reoxidiert.

6 läßt sich nur bei Ausschluß von Oxidationsmitteln fassen. Während der Reduktion gibt es sich vorübergehend durch eine charakteristische Farbe (tiefrot) zu erkennen, welche mit Ablauf der Reoxidation der Farbe der Acridinbase 7 weicht. Die gleichzeitige Reduktion der Keto- und der Nitrogruppe (n) erfordert einen entsprechenden Überschuß an Atomäquivalenten Na. Das günstigste Verhältnis wird (empirisch) mit 24 Atomäqui-valenten Na pro Mol Ketongruppe und 6 Atomäquivalenten Na für jede zusätzliche Nitrogruppe angegeben (1).

9-Methylsubstituierte Acridinverbindungen sind durch Umsetzung von 2-Chlor-5-nitroacetophenon, 8, mit verschiedenen Anilin-derivaten, 9, erhältlich, Gleichungen 5-8, mit $R_2 = CH_3, OCH_3, NHCOCH_3$. Zunächst kondensiert man das Acetophenon 8 mit dem Anilinderivat 9 zum Diphenylaminketonderivat 10, dies ist in Gleichung 5 dargestellt. Die Zyklisierung von 10 führt im Gegensatz zur Zyklisierung der Diphenylamincarbonsäuren 3 unmittelbar zur Acridinverbindung 11, wie ein Blick auf Gleichung 6 lehrt. Dieser Reaktionsablauf wurde besonders von Ullman et al. (110) untersucht:

Die Ketonsynthese der Gleichung 5 benötigt einen Katalysator, weil das Chloratom von 8 vergleichsweise reaktions-träge ist. Katalytische Effekte werden für Cu, CuJ, KJ, Fe und Ni sowie für Zn (schwacher Effekt) beschrieben (11,19,26). Parasubstituenten im Anilinderivat 9 müssen, wenn sie eine erhebliche nukleophile Potenz aufweisen, geschützt werden. Das Einführen einer Schutzgruppe (z.B. $COCH_3$ bei $R_2 = NHCOCH_3$) schwächt die Nukleophilie des Parasubstituenten und bewirkt, daß die Kondensation der Gl. 5 eindeutig abläuft. Die Zyklisierung des Ketons 10 kann auf Grund seiner guten Löslichkeit in H_2SO_4 erfolgen. Ein Schwefelsäure/Eisessigge-misch ist auch hier aus präparativen Gründen der Umsetzung mit PCl_5 vorzuziehen.



Bei der Zyklisierung mit Schwefelsäure entsteht aus 10 das Acridinderivat 11, das unmittelbar aus schwach alkalischer Lösung freigesetzt wird. Im Verlauf dieser Reaktion wurde die Schutzgruppe am Substituent $R_2 = \text{OCH}_3$ und NHCOCH_3 hydrolysiert zu $R'_2 = \text{OH}$ und NH_2 , $R_2 = \text{CH}_3$ wird naturgemäß nicht angegriffen. Da in dieser Arbeit u. a. eine Methoxyverbindung 12 ($R'_2 = \text{OCH}_3$) erwünscht ist, muß 11 mit $R'_2 = \text{OH}$ als 11' zu 11'' gemäß Gleichung 7 remethyliert werden: Das Hydroxyacridinderivat 11' ist in KOH löslich und kann nach Williamson bzw. Borsche (14,67) zum Methyläther umgesetzt werden. Diese Ätherverbindung 11'' fällt in dem genannten Reaktionsmilieu aus, bevor der Ringstickstoff quarterniert wird. Da 11'' die Verbindung 11 für $R'_2 = \text{OCH}_3$ darstellt, kann diese Verbindung auch für die Fälle $R'_2 = \text{CH}_3$ und NH_2 mit Na/Hg oder Pd/H₂ zur Aminoverbindung 12 reduziert werden (97), Gleichung 8. Auf diesem Wege sind die in dieser Studie untersuchten trisubstituierten Verbindungen 12 zugänglich:

Für R'_2	= NH_2	2,7-DiA-9-MeA
R'_2	= OCH_3	2-A-7-Met-9-MeA
R'_2	= CH_3	2-A-7,9-DiMeA

Die Synthesevorschriften für diese Verbindungen sind im experimentellen Teil dieser Arbeit zusammengestellt.

1.2. Spektroskopische Untersuchungen

1.2.1 Allgemeine Regeln

Viele Eigenschaften konjugierter Verbindungen - so auch die der untersuchten Acridinderivate - werden durch die Zustände der π -Elektronen bestimmt.

Absorption und Emission von Strahlung im sichtbaren und ultravioletten Bereich lassen sich auf die Änderungen der Energie der π -Elektronen zurückführen.

Man beobachtet in den Lösungsspektren typische Absorptions- und Emissionsbereiche (Banden), die durch Lage, Intensität und Polarisierung gekennzeichnet sind.

In den Normaltemperaturspektren (20°C) erhält man in der Regel breite Absorptionsbanden. Bei Tieftemperatur (N₂, fl. Luft) beobachtet man eine Verschärfung der Banden, die Auflösung der Spektren wird entschieden verbessert.

1.2.2 Messung der Polarisierung der Banden (21,128)

Die Messung der Absorptions- und Lumineszenzpolarisierung beruht auf der Tatsache, daß von mehratomigen Molekülen während der Bestrahlung einer Lösung nur der Anteil der Moleküle absorbiert, dessen Absorptionsschwingung bei der eingestrahlten Wellenlänge eine Vektorkomponente des Übergangsmomentes in der Ebene des einfallenden Lichtes hat.

Hält man nun die Moleküle zur Vermeidung von Rotationen (Depolarisationen) in irgend einer Weise fest, so ist das den Empfänger der Meßvorrichtung erreichende Licht teilweise polarisiert. Durch Einbetten der untersuchten Verbindung in ein bei tiefer Temperatur glasartig erstarrtes Lösungsmittel, z.B. Äthanol bei -195°C, kann dies erreicht werden.

Die Polarisierung des Lumineszenzlichtes ist nun wie folgt definiert:

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}$$

$I_{\parallel}$ und $I_{\perp}$ bedeuten die parallel bzw. senkrecht zum elektrischen Vektor des linear polarisierten Erregerlichtes schwingenden Anteile des Lumineszenzlichtes.

P nimmt bei Verbindung mit maximal zweizähliger Hauptsymmetrieachse Werte zwischen +0,5 und -0,3 an.

Die Extremwerte werden erreicht, wenn Emissions- und Absorptionssoszillator entweder parallel ($P = +0,5$) oder senkrecht ($P = -0,3$) aufeinander stehen. Für beliebige Winkel α zwischen Emissions- und Absorptionssoszillator beträgt der Polarisationsgrad (72,113):

$$P = -\frac{3 \cos^2 \alpha - 1}{\cos^2 \alpha + 1}$$

Innere und äußere Depolarisationsmechanismen verhindern, daß die theoretisch möglichen Grenzwerte tatsächlich erreicht werden.

Innere Depolarisation kann auftreten, wenn sich verschiedene Absorptionsbanden überlagern. Die Bande größter Intensität bestimmt dann im allgemeinen Betrag und Vorzeichen des Polarisationsgrades.

Äußere Depolarisationsmechanismen sind Rotationsdepolarisation und Konzentrationsdepolarisation. Die Rotationsdepolarisation tritt auf, wenn bei gegebener Temperatur eine zu geringe Viskosität des Lösungsmittels den Molekülen erlaubt, während der Anregungszeit ihre räumliche Lage zu ändern.

Die Konzentrationsdepolarisation wird dadurch hervorgerufen, daß Energiewanderung zwischen benachbarten Molekülen stattfindet, die eine verschiedene räumliche Lage zueinander einnehmen.

Die Lumineszenz kann als Fluoreszenz oder als Phosphoreszenz auftreten. Beide Arten der Emission sind zur Messung von Polarisationspektren verwendbar.

Das Absorptionsspektropolarisationsspektrum APF beschreibt den Polarisationsgrad P ($\tilde{\nu}_A$) als Funktion der Wellenzahl $\tilde{\nu}_A$ des Absorptionsspektrums A bei festgehaltener Wellenzahl $\tilde{\nu}_F$ des Fluoreszenzlichtes F. Das Fluoreszenzspektropolarisationsspektrum FP beschreibt den Polarisationsgrad P ($\tilde{\nu}_F$) als Funktion der Wellenzahl $\tilde{\nu}_F$ des Fluoreszenzspektrums bei festgehaltener Wellenzahl $\tilde{\nu}_A$ des Erregerlichtes. Die konstanten Wellenzahlen $\tilde{\nu}_F$ und $\tilde{\nu}_A$, auf die sich die APF- und FP-spektren beziehen, sind in den abgebildeten Spektren der folgenden Seiten durch

Pfeile gekennzeichnet. Entsprechende Polarisationspektren, die sich auf die Phosphoreszenz der Moleküle beziehen, wurden, da die hier untersuchten Verbindungen nicht phosphoreszieren, nicht in den Kreis der Erörterungen einbezogen. Für dies würde Analoges zur Floreszenzpolarisation gelten.

1.3 Quantenmechanische Modellrechnungen zur Elektronenspektroskopie. Die PPP-Methode, ihre semiempirischen Parameter

Quantenmechanisch wird ein Molekülzustand durch die Eigenfunktionen Ψ_L und deren Eigenenergien E_L charakterisiert. Beide sind im Prinzip mithilfe der Schrödingergleichung zu berechnen. Leider ist diese Grundgleichung nur für wenige einfache Fälle in geschlossener Form lösbar. Daraus ergab sich die Notwendigkeit, Näherungsverfahren zu entwickeln, die bei vernünftigem Aufwand an Rechenzeit abschätzbar genaue Ergebnisse erwarten lassen. R. Pariser, R.G. Parr und J.A. Pople haben ein solches Verfahren beschrieben (70,71). Die Einzelheiten der "PPP-Methode" brauchen an dieser Stelle nicht mehr abgehandelt zu werden. Sie sind an anderer Stelle eingehend diskutiert worden (22,25,37,45,56,57,58,105,126). Es werden hier nur die wichtigsten Gleichungen wiederholt.

Ausgangspunkt der Methode ist die Schrödingergleichung (Gl.9):

$$\mathcal{H}_L \Psi_L = E_L \Psi_L \quad \dots \dots \dots (9)$$

Es bedeuten die Symbole der Gl.9: $\mathcal{H}_L$ = der Hamiltonenergieoperator, E_L = Energieeigenwerte, Ψ_L = zugehörige Eigenfunktionen. Zur Lösung dieser Gleichung bedient man sich des Entwicklungssatzes der Quantenmechanik: Jede normierbare Funktion Ψ_L kann in einer Basistransformation als Summe von Funktionen dargestellt werden, welche einen vollständigen Satz von Basisfunktionen repräsentieren. Ist der Satz nicht vollständig, so läßt sich die Genauigkeit abschätzen (Löwdin,54).

In der PPP-Methode bedient man sich dieses Prinzips zweimal. Man führt die Gesamtwellenfunktion Ψ_L auf eine Linearkombination über antisymmetrische Slaterdeterminanten Φ_k aus - siehe Gl. 11 - Molekülorbitalen (MOs) χ_λ zurück. Schließlich approximiert man diese Molekülorbitale χ_λ durch eine Linearkombination aus Atomorbitalen (AOs) φ_μ , Gl.10.

Diese Basistransformationen werden wie folgt formuliert:

$$\chi_\lambda = \sum_{\mu} c_{\lambda\mu} \varphi_\mu \quad c_{\lambda\mu} \text{ Entwicklungskoeffizienten in der AO-Basis} \quad \dots (10)$$

Aus den MOs baut man Konfigurationen der N -Elektronen des Moleküls auf, die antisymmetrisch bezüglich der Koordinaten sind, die Slaterdeterminanten. Mit diesen

$$\Phi_{(i \dots j \dots N)}^k = \frac{1}{\sqrt{N}} \det \begin{vmatrix} \chi_i^1 & \dots & \chi_i^i & \dots & \chi_i^j & \dots & \chi_i^N \end{vmatrix}$$

Konfigurationen wird die Gesamtwellenfunktion approximiert.

$$\Psi_L = \sum_{k(1 \dots i \dots j \dots N)} c_k \cdot \Phi_{k(1 \dots i \dots j \dots N)} \quad c_k \text{ Entwicklungskoeffizienten in der Basis der Konfigurationen} \quad \dots (11)$$

Der Grundzustand eines Moleküles wird mit einer Slaterdeterminante beschrieben, die in einem System von N Elektronen aus $N/2$ SCF-MOs gebildet wird, welche mit je zwei Elektronen antiparallelen Spins besetzt sind, Gl.12:

$$\Psi_{(1 \dots N)} = \Phi_{(1 \dots i \dots j \dots N)} = \begin{vmatrix} \chi_1^1 & \chi_1^{2*} & \dots & \chi_\lambda^i & \chi_\lambda^{j*} & \dots & \chi_{N/2}^{(N-1)} & \chi_{N/2}^{(N)} \end{vmatrix} \dots (12)$$

Bei der Elektronenanregung geht ein Elektron aus einem besetzten MO χ_λ in ein unbesetztes MO χ_λ' über. Es entsteht im allgemeinen Fall ein einfach oder mehrfach angeregter Singulett- oder Multipllettzustand. Für den Fall eines einfach angeregten Zustandes ist folgende Linearkombination von Determinanten zu formulieren:

$$\Psi_{(1 \dots N)}^k = \Phi_{(1 \dots \lambda \dots \lambda')}^k = \frac{1}{\sqrt{2}} \left(\begin{vmatrix} \dots & \chi_\lambda^{(i-1)} & \chi_\lambda^{(i)} & \dots \end{vmatrix} \pm \begin{vmatrix} \dots & \chi_\lambda^{(i-1)} & \chi_\lambda^{(i+1)} & \dots \end{vmatrix} \right) \dots (13)$$

+ Zeichen für Singulett-, - Zeichen für den Tripletzustand.

Auf diese Weise sind ∞ viele Konfigurationen, einschließlich derer, die Kontinuumszuständen entsprechen, erfaßbar.

Da das System der Gl.9 praktisch nicht mehr lösbar wird, beschränkt man sich auf eine endliche Anzahl von Konfigurationen. Man erhält dadurch eine obere Schranke für die wahre Energie. Wird Gl.11 in 9 eingesetzt, lautet die Schrödingergleichung

in der Formulierung nach Hartree, Fock und Roothaan (86):

$$\sum_k (H_{kl} - E \delta_{kl}) c_{kl} = 0 \quad \dots \dots \dots (14)$$

In dieser "HFR-Schreibweise" bedeutet nun:

$$H_{kl} = \langle \Phi_k | H | \Phi_l \rangle = \int \Phi_k | H | \Phi_l d\tau, \dots \dots \dots (15)$$

die Matrixdarstellung des vollständigen H-operators in der Basis der Konfigurationen. Φ_k und Φ_l sind verschiedene Konfigurationen, c_{kl} die Entwicklungskoeffizienten, wie in Gl.11 definiert, für $k=l \rightarrow E_{kl}$ die Energieeigenwerte, δ_{kl} das Kroneckersymbol. Die Lösung des Systems erfolgt nach dem Ritzschen Algorithmus für Variationsprobleme durch Minimieren der Energie (87).

Werden entsprechend den von Slater (106) angegebenen Regeln die Matricelemente H_{kl} berechnet, so verschwinden die Matricelemente, wenn sich Konfigurationen in mehr als zwei Basis-MOs unterscheiden. Werden die Basis-MOs dazuhin aus SCF-MOs, wie sie in Gl.10 entwickelt werden, aufgebaut, so verschwinden auch Matricelemente, welche eine Wechselwirkung zwischen Grundkonfiguration und einfach angeregten Zuständen repräsentieren (Brillouin-Theorem). Die Zahl der in 15 auftretenden Matricelemente wird a) dadurch erheblich verkleinert, b) ist die Zahl der gemäß 13 zu berücksichtigenden Konfigurationen wesentlich geringer. Nach Mataga läßt sich diese Zahl nun weiter verkleinern (57), wenn die noch zu besprechenden Integrale $J_{\mu\nu}$, welche ebenfalls einen Teil der Elektronenkorrelation erfassen, empirisch günstig angepaßt werden.

Die Matricelemente von 15 zu berechnen aber stellt die Aufgabe dar, die Integrale über die Konfigurationen Φ_k in Terme aus SCF-MOs, also deren Basis, Terme aus AOs auszudrücken. Dies bedeutet aber, die Schrödingergleichung 14 in die Basis der AOs zu transformieren:

$$\sum_\lambda (H_{\lambda\mu} - E \delta_{\lambda\mu}) c_{\lambda\mu} = 0 \quad \dots \dots \dots (16)$$

In diesem System von μ Gleichungen läßt sich nun nach dem auf Seite 16 schon Bemerkten die Beschreibung eines π -Mehrelektro-nensystems mit expliziter Berücksichtigung der π -Elektronen-wechselwirkung im Bilde unabhängiger Teilchen sehen, wenn folgende zusätzliche Näherungen eingeführt werden:

- a) Born-Oppenheimer-Näherung, welche Kern- und Elektronenbewegungen trennt (13).
- b) Separation der σ - und π -Elektronen und damit Einführung eines mittleren, effektiven Gerüstpotentials, in welchem sich die π -Elektronen bewegen.

Die Terme in Gl.16 bedeuten:

$c_{\lambda\mu}$ die Entwicklungskoeffizienten der MOs in der Basis der AOs, definiert durch Gl.10

$E_{\lambda\mu}$ die Energieeigenwerte der SCF-MOs in dieser Basis ($\lambda=\mu$).

$S_{\lambda\mu}$ das Überlappungsintegral zweier MOs χ_λ und χ_μ in der Basis der AOs

$H_{\lambda\mu}$ die Matrixdarstellung des Hamiltonoperators der π -Elektronen in der SCF-MO-Darstellung der AO-Basis, HFR-Operator.

Die Komponenten der Matrixdarstellung von $H_{\lambda\mu}$ errechnen sich aus folgenden Anteilen: $U_{(i)}$ ist der Operator für das effektive Gerüstpotential, welches von den Atomrümpfen des Moleküles dadurch gebildet wird, daß das Atom $j = 1$ oder 2 π -Elektronen an ein konjugiertes System abgibt und formal eine oder zwei positive Kernladungen annimmt. $[-\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2]$ ist der Operator der kinetischen Energie des π -Elektrons $i(N)$ im Felde aller anderen und des molekularen Rumpfpotentials. Diese beiden Operatoren werden zum effektiven Einteilchenoperator $H_{eff(i)}$ zusammengefaßt.

Matrixdarstellung über SCF-MOs

$$H_{eff(i)} = \sum_{\lambda\mu} \int \chi_\lambda^* \left| \underbrace{U_i - \frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2}_{H_{eff(i)}} \right| \chi_\mu d\tau_i, \dots \dots (17a)$$

Matrixdarstellung in der AO-Basis

$$H_{eff(i)} = \sum_{\lambda\mu} \int \chi_\lambda^* \left| \frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 \right| \chi_\mu d\tau_i, \dots \dots (17b)$$

Die Elektronenwechselwirkung wird in einem Coulombterm und einem Austauschterm erfaßt. Sie tragen der Tatsache Rechnung, daß sich

1. zwei Elektronen antiparallelen Spins beliebig nähern könnten, was das Coulombsche Abstoßungspotential tatsächlich verhindert, und
2. zwei Elektronen parallelen Spins in der Funktion ihrer

Aufenthaltswahrscheinlichkeiten an der Stelle des anderen den Wert 0 aufweisen, d.h. gleiche Orte verboten sind. Die Paulische Korrelation des Spins zweier Elektronen wird somit explizit berücksichtigt.

Der Coulombterm zweier π -Elektronen i und j in den MOs χ_λ und χ_μ lautet (18a):

$$I_{\lambda\mu}^{ij} = \sum_{\lambda\mu} \int \chi_\lambda^* \chi_\mu \left| \frac{e^2}{r_{ij}} \right| \chi_\lambda^* \chi_\mu d\tau_{ij} \dots \dots (18a)$$

bzw. in der AO-Basis (18b):

$$I_{\lambda\mu}^{ij} = \sum_{\lambda\mu} \int c_\lambda^i c_\mu^j \left| \frac{e^2}{r_{ij}} \right| c_\lambda^i c_\mu^j d\tau_{ij} \dots \dots (18b)$$

Der Austauschterm zweier π -Elektronen, die sich in den MOs χ_λ und χ_μ aufhalten, lautet (19a):

$$K_{\lambda\mu}^{ij} = \sum_{\lambda\mu} \int \chi_\lambda^* \chi_\mu \left| \frac{e^2}{r_{ij}} \right| \chi_\mu^* \chi_\lambda d\tau_{ij} \dots \dots (19a)$$

bzw. in der AO-Basis (19b):

$$K_{\lambda\mu}^{ij} = \sum_{\lambda\mu} \int c_\lambda^i c_\mu^j \left| \frac{e^2}{r_{ij}} \right| c_\mu^i c_\lambda^j d\tau_{ij} \dots \dots (19b)$$

Die Matrixdarstellung des HFR-Operators (Gl.16) ergibt sich dann wie folgt (Gl.20a):

$$H_{\lambda\mu} = 2 H_{eff(i)} + \sum_{j\mu} (2 I_{ij} - K_{ij}) \dots \dots (20a)$$

Mit $P_{\lambda\mu} = 2 \sum_i c_\lambda^i c_\mu^i$ der "Einteilchendichtematrix" gilt für die Darstellung in der AO-Basis:

$$H_{\lambda\mu} = \sum_{\lambda\mu} P_{\lambda\mu} H_{eff(i)} + \sum_{j\mu} P_{\lambda\mu} (I_{ij} - \frac{1}{2} K_{ij}) \dots (20b)$$

Die Grundlage für die praktische Anwendbarkeit dieses Formalismus auf Moleküle mit N π -Elektronen bildet die ZDO-Näherung, (zero-differential-overlap):

$$P_{\lambda\mu}^{(ij)} = 0 \dots \dots (21)$$

Die Zahl der in $H_{\lambda\mu}$ zu berechnenden Matrixelemente verkleinert sich dadurch erheblich. Vierzentrenintegrale entfallen ebenso wie die über drei Zentren. Übrig bleiben nur Coulombintegrale über maximal zwei Zentren (Gl.22):

$$I_{\lambda\mu}^{ij} = I_{\lambda\mu}^{ij} = \int c_\lambda^i c_\mu^j \left| \frac{e^2}{r_{ij}} \right| c_\lambda^i c_\mu^j d\tau_{ij} \dots \dots (22a)$$

$$\Rightarrow \delta_{\lambda\sigma} \delta_{\mu\eta} \int c_\lambda^i c_\mu^j \left| \frac{e^2}{r_{ij}} \right| c_\lambda^i c_\mu^j d\tau_{ij} = \delta_{\lambda\sigma} \delta_{\mu\eta} I_{\lambda\mu}^{(ij)} \dots \dots (22b)$$

Zusätzliche semiempirische Näherungen der Integrale in $H_{\mu\mu}$ vereinfachen die Lösung von Gleichung 16 und erlauben eine Anpassung der Integrale an experimentelle Daten.

Die in Gl. 21 zu bestimmenden Einzentrenintegrale $J_{\mu\mu}$ werden aus den experimentell ermittelten Ionisationspotentialen $I_{p\mu}$ und den Elektronenaffinitäten des Atoms μ bestimmt, Atom = Zentrum:

$$J_{\mu\mu} = I_{p\mu} - A_{\mu} \quad \dots \quad (23)$$

Die in Gl. 21 noch zu bestimmenden Zweizentrenintegrale $J_{\lambda\mu}$ werden nach einem Vorschlag von Mataga (57) empirisch wie folgt angepasst:

$$J_{\lambda\mu} = \frac{1}{R_{\lambda\mu} + a_{\lambda\mu}} \quad \dots \quad (24)$$

$R_{\lambda\mu}$ ist der Abstand zweier Zentren λ und μ . Es gilt für $\frac{1}{a_{\lambda\mu}} = J_{\mu\mu}$, für große $R_{\lambda\mu} \Rightarrow J = \lim_{R_{\lambda\mu} \rightarrow \infty} \frac{1}{R_{\lambda\mu}}$.

Der effektive Gerüstterm in 17a bzw. 17b wird in zwei Anteile zerlegt. Die Außerdiagonalelemente werden als empirische Parameter behandelt. Sie werden = 0 gesetzt, wenn die Zentren λ und μ nicht benachbart sind.

$$J_{\lambda\mu} = \int \psi_{\lambda}^* |h_{eff}| \psi_{\mu} d\tau \quad \begin{cases} = 0 \text{ für } \lambda \neq \mu \pm 1 \\ = J_{\lambda\mu} \text{ für } \lambda = \mu \pm 1 \end{cases} \quad \dots \quad (25)$$

Die Diagonalelemente des effektiven Gerüstterms werden näherungsweise nach Goeppert-Mayer und Sklar berechnet (30):

$$J_{\mu\mu} = \int \psi_{\mu}^* |h_{eff}| \psi_{\mu} d\tau = W_{\mu} - \sum_{\lambda \neq \mu} (n_{\lambda} J_{\lambda\mu} + \int \psi_{\mu}^* |U_{\lambda}| \psi_{\lambda} d\tau) \quad \dots \quad (26)$$

Die Summe $\lambda \neq \mu$ läuft über alle Zentren des Moleküles, n_{λ} ist die Zahl der π -Elektronen, die das Zentrum $\lambda \neq \mu$ zum konjugierten π -System beisteuert ($n = 0, 1$ oder 2).

W_{μ} ist als negatives Ionisationspotential zu deuten, welches dem Zentrum μ im Valenzzustand zukommt. U_{λ} ist das Potential eines neutralen Atoms λ . Es bildet den Anteil der Durchdringungsintegrale an den Zentren, welche kein π -Elektron an das konjugierte System abgeben. Sie streben mit zunehmendem Abstand vom Zentrum rasch gegen 0 und werden vernachlässigt, wenn λ und μ nicht

nächste Nachbarn sind:

$$\langle \mu | u_\lambda | \lambda \rangle = \int \psi_\mu^* |u_\lambda| \psi_\lambda d\tau \begin{cases} = 0 \text{ für } \lambda = \mu \pm 1 \\ \neq 0 \text{ für } \lambda = \mu \pm 1 \end{cases} \quad (27)$$

Ihr Beitrag ist nahezu unabhängig von der Art der Zentren.

Er wird konstant zu α_μ hinzuaddiert, wenn das Zentrum μ eine gleichbleibende Anzahl Nachbaratome λ besitzt (im Regelfall 3).

Setzt man nun bezüglich eines Kohlenstoffatoms

$$W_C = \sum_{\lambda'} \langle \mu | u | \lambda' \rangle \quad (28)$$

als Nullpunkt der Energieskala, wobei die Summe λ' über alle dem Kohlenstoff benachbarte Atome λ' läuft, wird 26 zu 29 vereinfacht:

$$\alpha_\mu^C = - \sum_{\lambda' \neq \mu} n_z \gamma_{\mu\lambda'} \quad (29)$$

Für Heteroatome N, O, S = X gilt dann:

$$\alpha_\mu^X = \delta W_X - \sum_{\lambda' \neq \mu} n_z \gamma_{\lambda'\mu} \quad (30)$$

$$\text{mit } \delta W_X = - \alpha_\mu^C - \sum_{\lambda' \neq \mu} n_z \gamma_{\lambda'\mu}$$

$$\text{und } \delta W_X = W_C - W_X$$

Wie aus der Umformung von 20a zu 20b ersichtlich ist, tritt im Formalismus eine Größe $P_{\lambda\mu}$ auf, welche als "Dichtematrix" interpretiert wird. Im π -Elektronenmodell werden nun die Diagonalelemente $P_{\lambda=\mu}$ mit der π -Elektronendichte am Zentrum $\lambda = \mu$ identifiziert, die Außerdiagonalelemente $P_{\lambda\mu}$ werden als allgemeine π -Bindungsordnung benachbarter Zentren λ und μ gedeutet.

Da ψ in Gl.15 durch die Transformationen Gl.12 und Gl.10 auf ψ_μ zurückgeführt wird, kann $P_{\lambda\mu}$ für alle gemäß Gl.13 berücksichtigten Konfigurationen berechnet werden. Wird $P_{\lambda\mu}$ in der Form dargestellt, daß für beliebige Zentren λ, μ Werte zwischen -1 und +1 zutreffen, kann für benachbarte Zentren $\lambda = \mu \pm 1$ eine spezielle π -Bindungsordnung zwischen 0 und +1 erhalten werden.

Nach Dewar und Gleicher (22) darf nun zwischen der Länge einer chemischen Bindung, entsprechend dem Abstand zweier Zentren des Moleküles, und der π -Bindungsordnung eine Beziehung der Form

$$R_{\lambda\mu} = A_0 - A_1 P_{\lambda\mu} \quad (31)$$

diskutiert werden.

$R_{\lambda\mu}$ ist die Matrixdarstellung der Abstände der Zentren λ und μ , die Parameter A_0 und A_1 sind abhängig von der Art der an der Bindung beteiligten Atome $C = C$, $C = N$ oder $C = O$ empirisch anzupassen. Diese Gleichung gestattet es, Bindungsabstände mit der Dichtematrix bzw. der π -Bindungsordnung zu korrelieren, also experimentell ermittelte Molekülgeometrien bei der Anpassung der Integrale zur Lösung von Gl.16 zu berücksichtigen.

Zur Lösung von Gl. 16 können daher die zwei folgenden Wege beschritten werden:

Zum einen erfolgt die Anpassung der Integrale α, β, γ und δ_{wx} unter zusätzlicher Konvergenz von $R_{\lambda\mu}$. Dieses Vorgehen wird als "R-Variationsrechnung" bezeichnet.

Zum anderen ist die Lösung von Gl.16 auf der Basis konstanter, idealisierter Bindungslängen, über welche lediglich die korrekte Molekülsymmetrie berücksichtigt wird, möglich. Dieses Vorgehen ist dann angezeigt, wenn man nicht über experimentell bestimmte Bindungslängen des Moleküls verfügt. Der Parametersatz dieser Arbeit wurde durch Eichrechnungen mit und ohne R-Variationsrechnung an aromatischen Kohlenwasserstoffen und an heterozyklischen Aromaten zusammengestellt und auf die Acridinverbindungen dieser Arbeit angewandt (112). Bei den Rechenergebnissen dieser Arbeit wird jeweils angegeben, ob der eine oder der anderen Lösungsweg beschritten wurde.

Der Parametersatz dieser Arbeit					
Tabelle 1					
Atom- typ	Parameter $\gamma_{\mu\mu}$	δ_{wx}	Parameter Typ der Bindung	$\beta_{\lambda\mu}^{(63)}$ x y	$R_{\lambda\mu}^{(22)}$ A_0 A_1
C^+	11,8	0,0	C-C	-1,88 -0,51	-1,514 0,176
C_{methyl} subst.	11,01	-0,15	C-N	-2,06 -0,53	-1,448 0,178
N^+ aza	12,34	-2,35	C-O	-2,28 -0,59	-1,395 0,165
N^{++} amin	12,85	-11,47			
N^{++} quart./ proton.	13,85	-8,90			
O^{++} äther	14,52	-13,50			

1.4 Meßergebnisse und ihre Auswertung

1.4.1 Messungen bei Tieftemperatur

1.4.1.1 Beschreibung der Elektronenspektren

Spektroskopische Studien an Aminoacridinverbindungen sind schon vor 30 Jahren veröffentlicht worden (D.P. Craig et al. 20). Apparative Verbesserungen und Erweiterungen haben Fortschritte in der Deutung der Spektren erlaubt. Die von uns untersuchten Tieftemperaturspektren sind in den Abbildungen 1 - 10 wiedergegeben, als allgemeiner Befund ergab sich: Auf Grund ihrer spektroskopischen Eigenschaften lassen sich die hier untersuchten Verbindungen in zwei Gruppen einordnen, die Gruppe der Monoaminoacridinderivate 2-AA, 2-A-7,9-DiMeA und 2-A-7-Met-9-MeA, sowie die Gruppe der Diaminoacridinderivate 2,7-DiAA und 2,7-DiA-9-MeA.

Die Übereinstimmung spektroskopischer Eigenschaften innerhalb dieser Gruppen war so deutlich ausgeprägt, daß zunächst erhebliche Unterschiede bei den Ergebnissen der biologischen Untersuchungen an den Verbindungen innerhalb einer Gruppe nicht erwartet wurden!

1.4.1.2 Die Gruppe der Monoaminoacridinderivate

Die Spektren dieser Verbindungen sind im vermessenen Spektralbereich von 16-50 KK sehr ähnlich. Die langwellige Absorptionsbande der Basen bei 22 KK erreicht einen molaren Extinktionskoeffizienten von $\log \epsilon = 3,8 - 4$. Sie ist bei diesen Verbindungen die Farbbande und für die schwach gelbliche Farbe der freien Base verantwortlich. Die Bande ist breit und nicht als strukturiert zu bezeichnen. Die zugehörige Fluoreszenzbande ist stärker ausgeprägt. Sie liegt für die untersuchten Verbindungen bei 19,4KK (2-AA), 20,1 KK (2-A-7,9-DiMeA) und bei 20,4 KK (2-A-7-Met-9-MeA); die Verbindungen fluoreszieren gelbgrün. Zwischen 28 und 30 KK zeigt sich eine weitere Bande, die deutlicher strukturiert ist. Sie weist nahezu dieselbe Extinktion auf wie die längstwellige Bande. Nach dem Verlauf des APF-Spektrums ist diese Bande als nahezu senkrecht zur längstwelligen Absorptionsbande polarisiert.

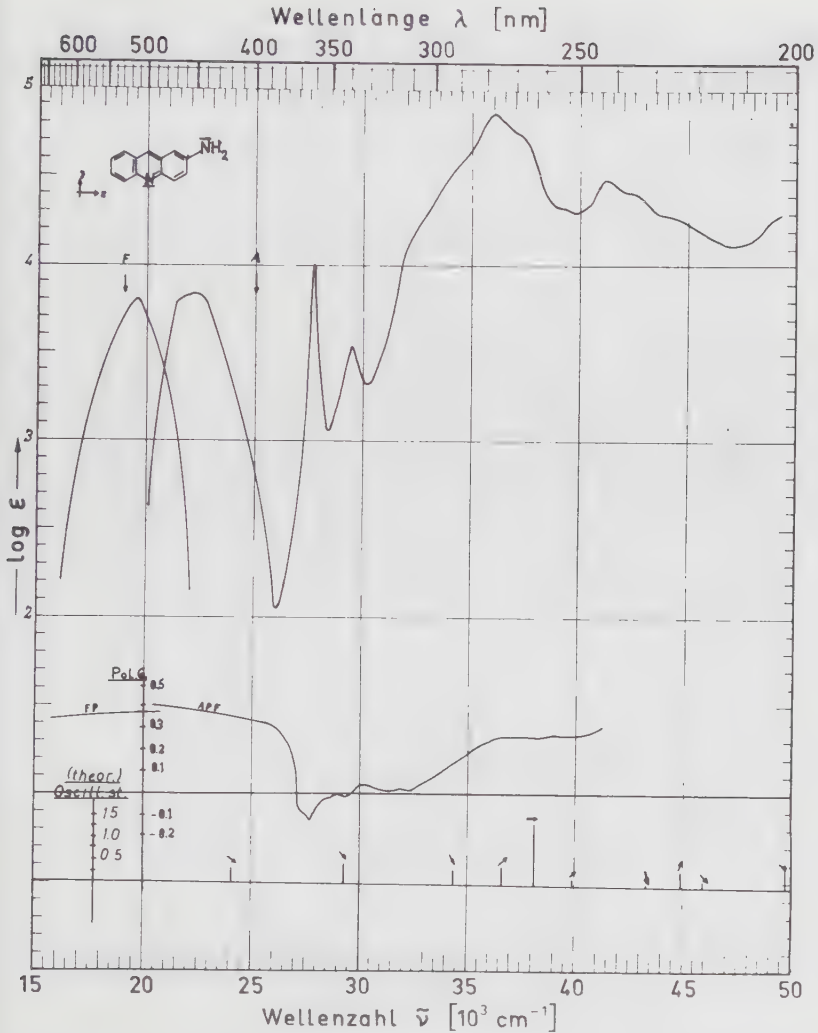


Abbildung 1: Spektren des 2-Aminoacridins

Lösungsmittel: Äthanol 95%, Temperatur: -195°C

$c = 2 \cdot 10^{-4} \text{ m}$

A Absorption, F Fluoreszenz

APF Absorptionspolarisation

FP Fluoreszenzpolarisation

Pfeile bei A und F Erregerwellenlängen für FP u. APF

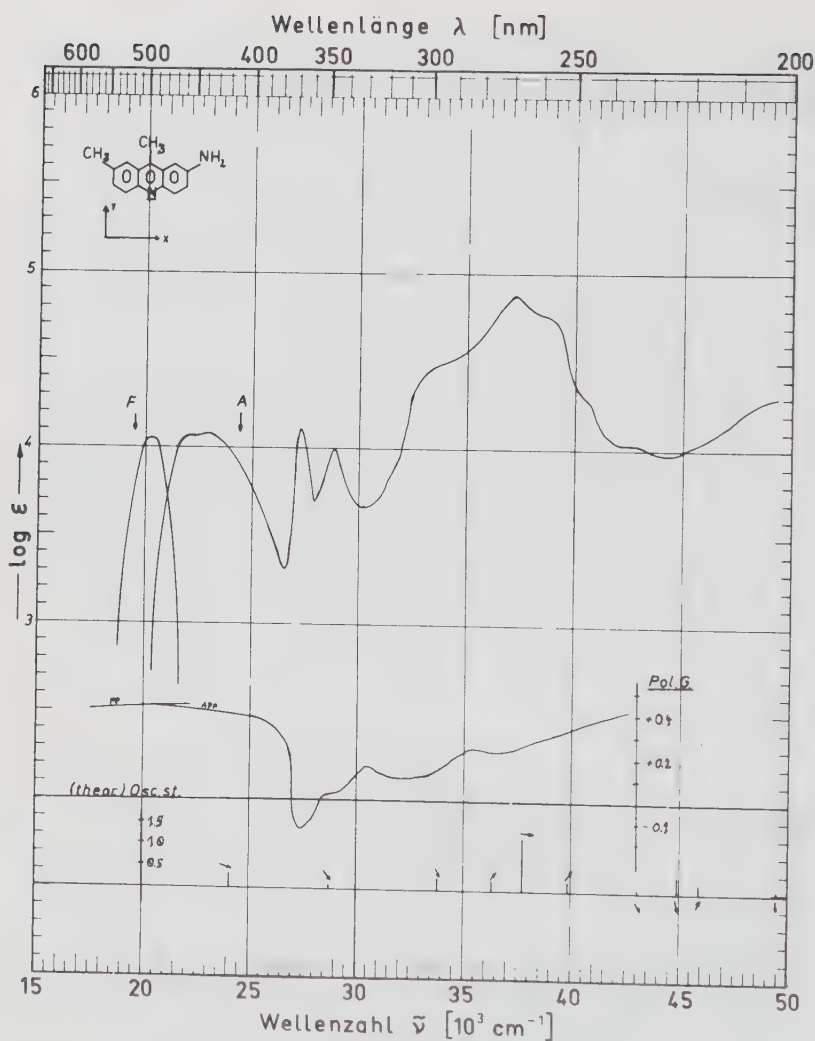


Abbildung 2: Spektren des 2-Amino-7,9-dimethylacridins
 Lösungsmittel: Äthanol 95%, Temperatur: -195°C
 $c = 10^{-4} \text{ m}$

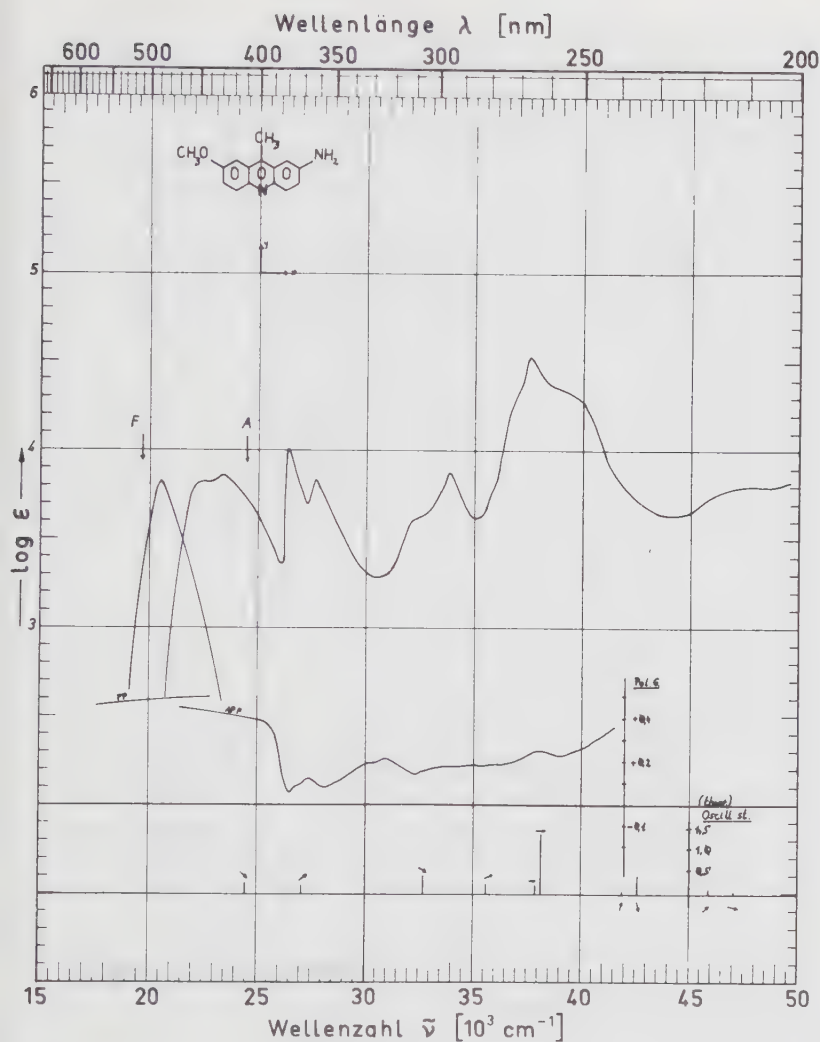


Abbildung 3: Spektren des 2-Amino-7-methoxy-9-methylacridins
 Lösungsmittel: Äthanol 95%, Temperatur: -195°C
 $c = 10^{-4} \text{ m}$

Schließlich beginnt am kurzwelligen Ende dieses Absorptionsbereiches der Anstieg der Extinktion zur intensiven UV-Bande mit $\log \epsilon = 4,5 - 5$. Eine Schulter im Anstieg, die bei der Verbindung 2-A-7-Met-9-MeA zu einer unterscheidbaren Bande auswächst (Abb.3), gibt einen Hinweis, auf einen schwächeren Übergang, der auch im Polarisationspektrum angedeutet ist. Das intensive UV-Maximum dieser Verbindungen liegt über 36 KK und wird mit zunehmender Zahl der Substituenten am Ring nach steigenden Wellenzahlen verschoben: 2-AA/36,4 KK/, 2-A-7,9-DiMeA/37,0 KK/, 2-A-7-Met-9-MeA/38,3 KK/.

Lösungen einfach protonierter Verbindungen erhält man bei Titration der Basen mit einer äquimolaren Menge Säure.

Die Spektren solcher Lösungen zeigen im Vergleich zur freien Base eine bathochrome Verschiebung aller Banden.

Die längstwellige Bande ist einheitlich um 3 KK rotverschoben.

Sie bleibt breit und wenig strukturiert. Sie gewinnt nur unwesentlich an Intensität, $\log \epsilon$ nimmt ungefähr um 0,1 zu.

Die Fluoreszenzbande verhält sich entsprechend und ist bis auf 16,4 - 17,4 KK rotverschoben, (Abb. 4-6).

Die Verbindungen fluoreszieren rotorange.

Der zweite Absorptionsbereich wird nur um ca. 1,5 KK im Vergleich zu den Basen rotverschoben. Anhand des Abfalles im APF-Spektrum kann dieser Bereich wiedererkannt werden.

Im bathochrom verschobenen Anstieg zur intensiven Bande im UV beobachtet man auch bei den Kationen eine mehr oder weniger ausgeprägte Schulter, die ca. 1,5 KK rotverschoben ist.

Die intensive UV-Bande der Kationen selbst weist bei einer Extinktion von $\log \epsilon = 4,5 - 4,7$ wieder im Vergleich zu der der Basen eine stärkere bathochrome Verschiebung von 2,5 - 3 KK auf.

Der schon von V. Zanker (130) am 2-AA gemessene Verlauf der A-, F-, APF- und FP- Spektren wird bestätigt.

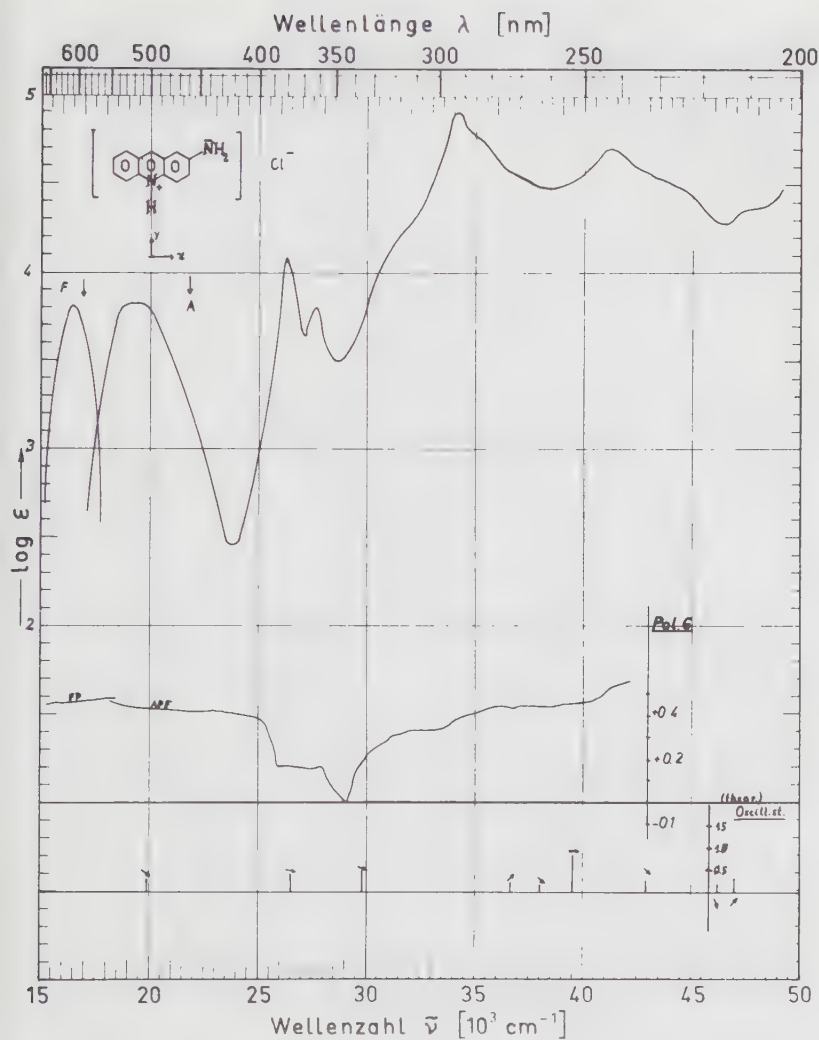


Abbildung 4: Spektren des 2-Aminoacridins, erste Protonierungsstufe
 Lösungsmittel: Alkohol 95%, Temperatur: -195°C
 $c = 2 \cdot 10^{-4} \text{ m}$

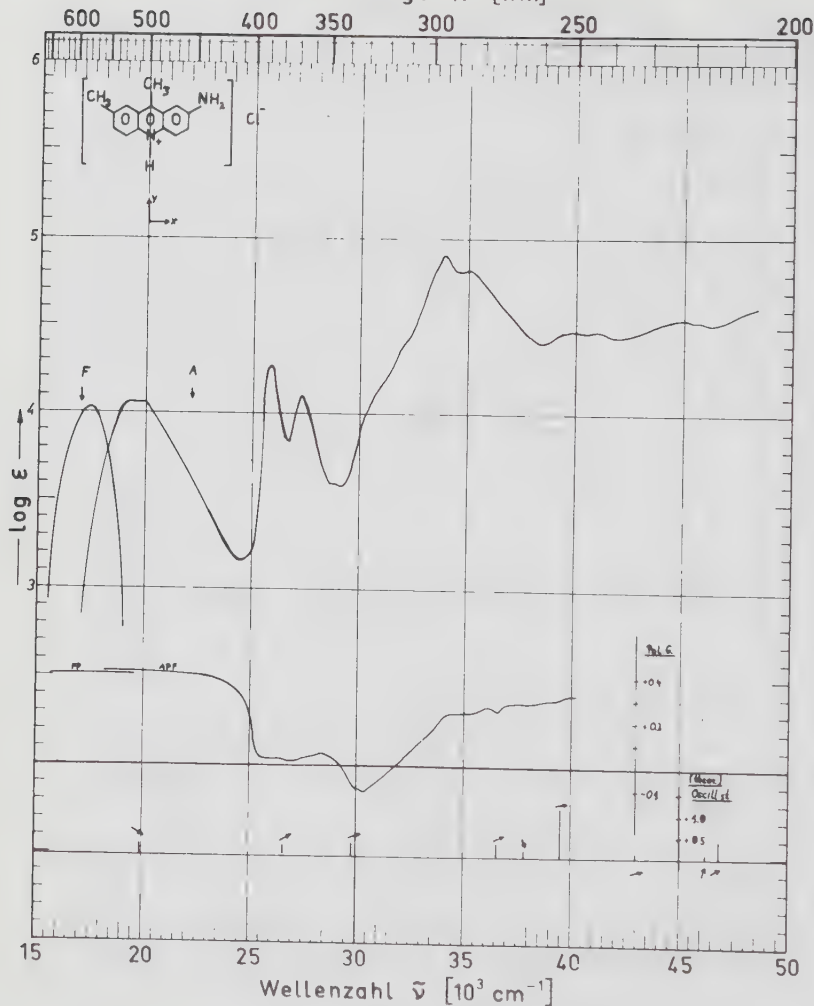


Abbildung 5: Spektren des 2-Amino-7,9-dimethylacridins, erste Protonierungsstufe

Lösungsmittel: Alkohol 95%, Temperatur: -195°C

$$c = 10^{-4} \text{ m}$$

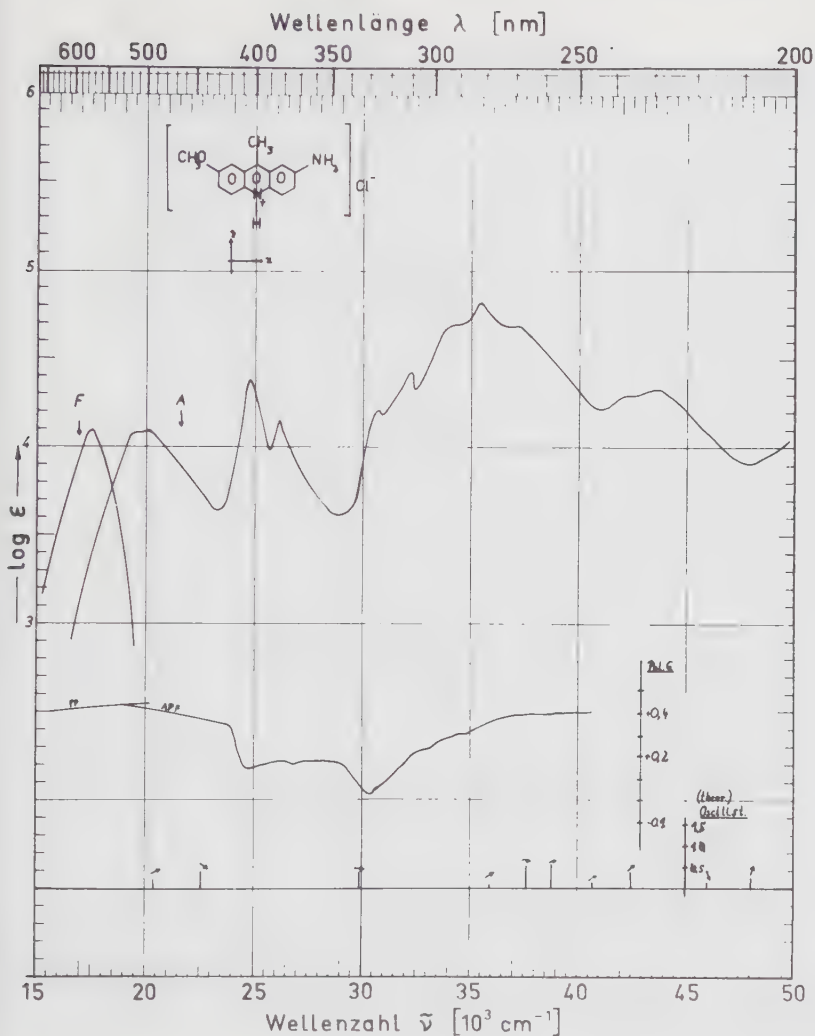


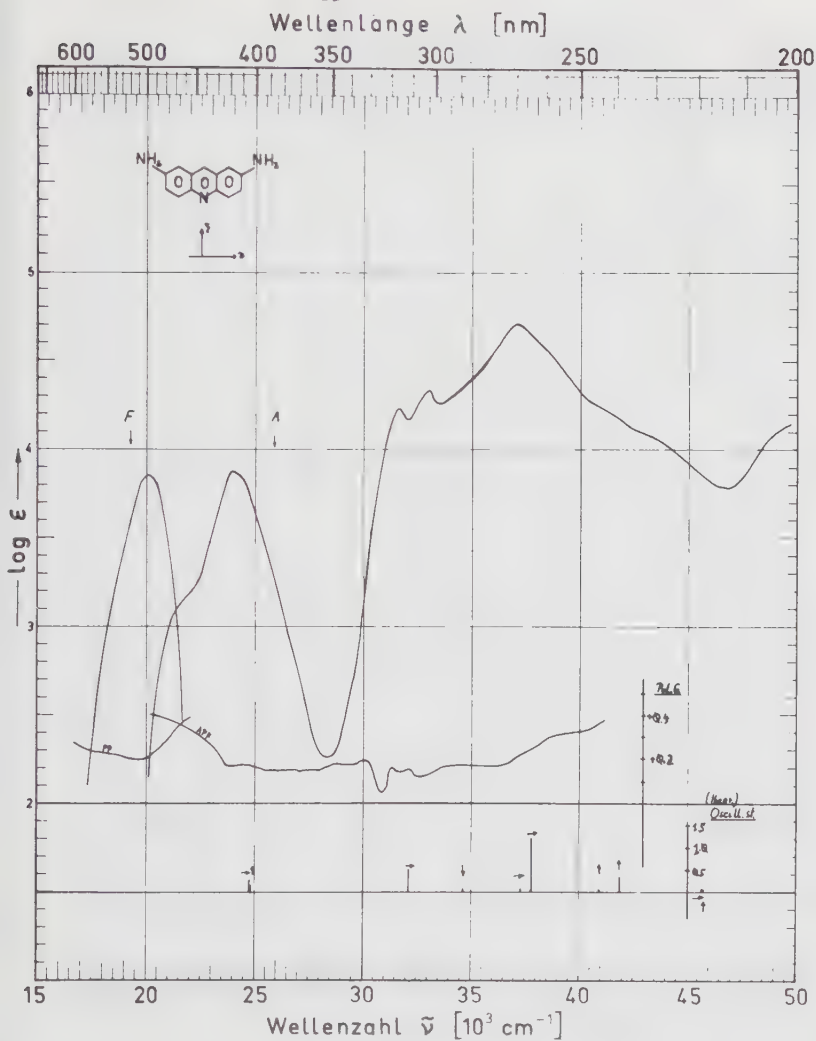
Abbildung 6: Spektren des 2-Amino-7-methoxy-9-methylacridins, erste Protonierungsstufe
Lösungsmittel: Alkohol 95%, Temperatur: -195°C
 $c \approx 10^{-4} \text{ m}$

1.4.1.3 Die Gruppe der Diaminoacridinverbindungen

Bei den Diaminoacridinderivaten 2,7-DiAA und 2,7-DiA-9-MeA lassen sich auf den ersten Blick nur zwei große Absorptionsbereiche erkennen, Abb. 7-10.

Die langwellige Absorptionsbande der Base bei 24 KK ist deutlich abgesetzt. Ihr molarer Extinktionskoeffizient beträgt $\log \epsilon = 3,8$. An der langwelligen Flanke dieser Bande beobachtet man eine Schulter, die sich bis ca. 20 KK zieht. Aus dem Verlauf des Polarisationsgrades dieser Bande muß auf zwei dicht nebeneinanderliegende, senkrecht zueinander polarisierte, unterschiedlich stark absorbierende Übergänge geschlossen werden. In den Spektren der einfach protonierten Moleküle (Abb. 9 und 10) ist dieser Absorptionsbereich um 2,5 KK bathochrom verschoben wieder aufzufinden. Der zweite Absorptionsbereich dieser Verbindungen wird bereits von der intensitätsstarken Bande im UV-Bereich gebildet. Im Anstieg der Extinktion verbirgt sich auch bei diesen Verbindungen noch eine intensitätsschwache Absorption, wie sie bei den Monoaminoacridinverbindungen beobachtet worden ist. Beide UV-Banden werden bei der einfachen Protonierung der Basen um ca. 2,5 KK von 37 KK auf 34,5 KK bathochrom verschoben. Die APF-Spektren weisen darauf hin, daß die Banden offensichtlich dieselbe Polarisation aufweisen wie die langwelligen Farbbanden bei 24 KK (Base) und 20,5 KK (Monokationen). Die Basen fluoreszieren gelborange, die Kationen rotorange. Auffallend ist der Verlauf der FP-Spektren: Im Fluoreszenzmaximum weist die Polarisation ein Minimum auf. Der Befund ist beim Kation des 2,7-DiAA am deutlichsten ausgeprägt. Er deutet darauf hin, daß die Emission in diesem Spektralbereich aus zwei zueinander senkrecht polarisierten Banden erfolgen kann.

Die hier vorgelegten Meßergebnisse der A-, F- und APF- Spektren am 2,7-DiAA stimmen mit den von V. Zanker (130) erhobenen experimentellen Befunden überein. Ergänzt wurde das FP- Spektrum, über welches V. Zanker keine Angaben gemacht hat.



Bildung 7: Spektren des 2,7-Diaminoacridins

Lösungsmittel: Alkohol 95%, Temperatur: -195°C

$c = 10^{-4} \text{ m}$

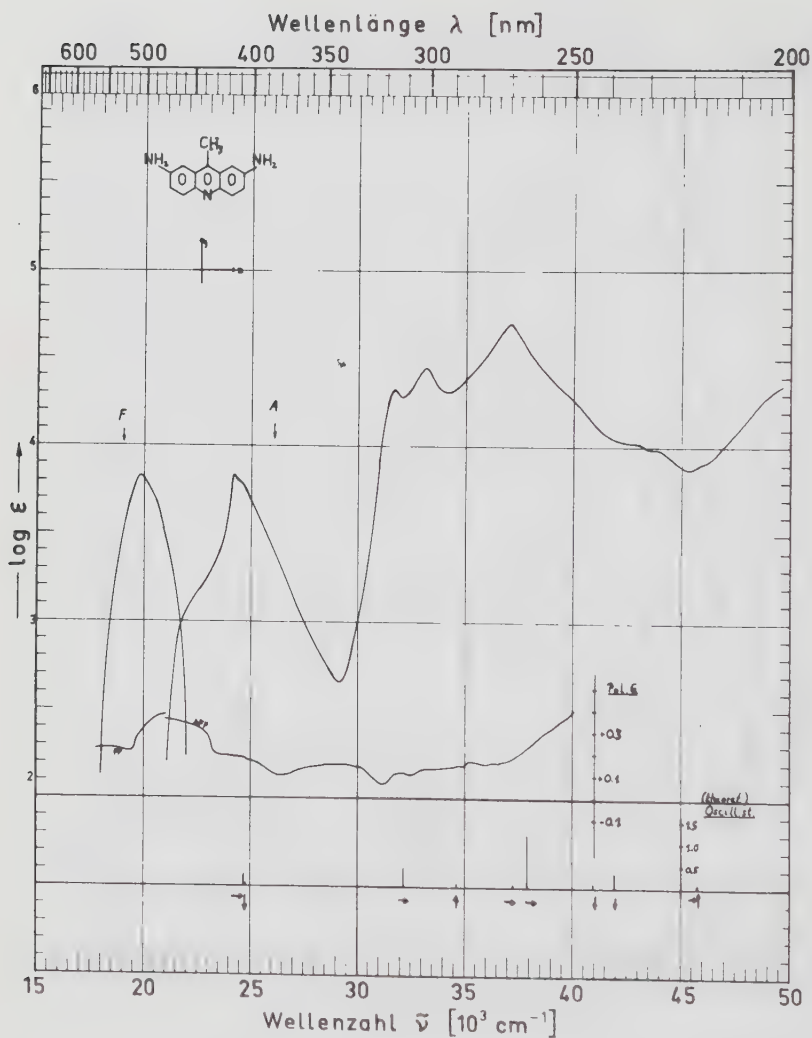


Abbildung 8: Spektren des 2,7-Diamino-9-methylacridins
 Lösungsmittel: Alkohol 95%, Temperatur: -195°C
 $c = 10^{-4} \text{ m}$

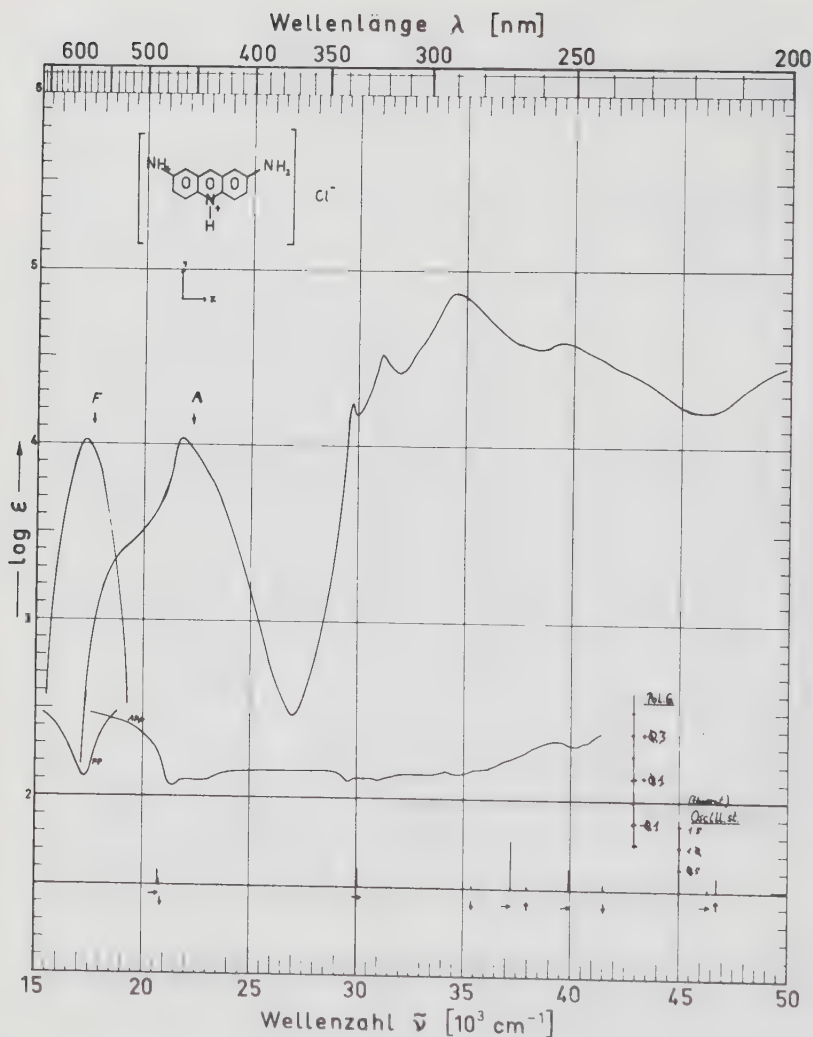


Abbildung 10: Spektren des 2,7-Diaminoacridins,
 erste Protonierungsstufe
 Lösungsmittel: Alkohol 95%, Temperatur: -195°C
 $c = 10^{-4} \text{ m}$

Zusammenfassend kann aus den vorgetragenen Meßergebnissen folgendes erkannt werden:

Durch Einführung einer Aminogruppe in 2-Stellung am Acridingrundkörper wird die längstwellige Absorptionsbande im Vergleich zum Grundkörper erheblich bathochrom verschoben: Es entsteht ein Fluoreszenzfarbstoff (1,3).

Bei Einführung einer zweiten Aminogruppe in 7-Stellung wird die längstwellige Absorptionsbande nicht wesentlich verschoben, zusätzlich entsteht jedoch eine vorgelagerte Schulter vor dieser Bande. Sie kann als die vergleichsweise deutlich bathochrom verschobene zweite Absorptionsbande der Monoamino-acridinderivate identifiziert werden, siehe auch die Abb. 21. Es kommt dadurch zur Ausbildung eines breiten Absorptionsbereiches, in welchem die O-O-Übergänge sehr dicht benachbart sind.

Darauf könnte es zurückzuführen sein, daß die Fluoreszenz aus beiden langwelligen Absorptionsbanden erfolgen kann. Außerdem wäre noch zu berücksichtigen, daß während der Lebensdauer des angeregten Zustandes Verschiebungen der O-O-Übergänge durch Umorientierung der Lösungsmittelmoleküle stattfinden könnten.

1.4.2. Diskussion der Spektren mithilfe quantenchemischer Rechnungen in PPP-Näherung

1.4.2.1. Einleitung

Die Charakterisierung von Elektronenübergängen substituierter Verbindungen sollte sich sinnvollerweise am Grundkörper einer Verbindungsklasse orientieren. Der Vergleich von Spektren aus der Aminoacridinreihe mit dem des Anthrazens muß jedoch auf Bedenken stoßen.

Schon der Einfluß des Stickstoffatoms in der Acridinbase, ausgeprägter noch im Acridiniumkation, stört das π -Elektronensystem im Vergleich zum Stammkohlenwasserstoff.

Wesentlich stärker stören die Substituenten das konjugierte Ringsystem, indem sie durch ihre I- und M-Effekte den Aufenthaltsbereich der π -Elektronen verändern. Eine Bandenzuordnung im Sinne der Nomenklatur nach Platt(77) ist nur noch dann gerechtfertigt, wenn Übergänge vergleichbare Übergangsladungsverteilungen beibehalten. Bei den Aminoacridinen ist ein direkter Vergleich mit den Banden des Anthrazens auf der Basis der Übergangsdichten nicht mehr möglich.

Wir haben nach den vorliegenden Berechnungen deshalb die Banden dieser Verbindungen nach Energie, Oszillatorenstärke und Polarisierung der Übergangsmomente individuell klassifiziert, (Einzelheiten der praktischen Durchführung der Rechnungen siehe im praktischen Teil der Arbeit). In den Abbildungen 1 - 10 sind die berechneten Übergänge als Strichspektren den experimentellen Spektren gegenübergestellt. Die nach Mulliken(61) berechneten Polarisierungen sind durch Pfeile an den Strichspektren gekennzeichnet. Sie beziehen sich jeweils auf das in den Abbildungen eingeführte Koordinatensystem des Moleküls. Die Rechenergebnisse sind in den nachfolgenden Tabellen 2 - 11 aufgeführt. In diesen sind die Übergänge nach Energien, Oszillatorenstärken und Polarisierungen charakterisiert. Hierbei beziehen sich M_x und M_y auf das eingeführte Koordinatensystem. In den Moleküldiagrammen, Abbildungen 11 - 16, sind die berechneten π -Bindungslängen, π -Bindungsordnungen und π -Elektronendichten eingetragen.

1.4.2.2. SCF-CI-Rechnungen an den Monoaminoacridinverbindungen

Die Verbindungen 2-AA, 2-A-7, 9-DiMeA und 2-A-7-Met-9-MeA gehören zur Symmetriegruppe C_s . Da in der Konfigurationswechselwirkung demnach alle (hier berücksichtigten Singulett-) Konfigurationen miteinander kombinieren können, sind die Übergänge nicht mehr wie beim Stammkohlenwasserstoff Anthrazen (Symmetriegruppe D_{2h}) in der langen oder kurzen Achse polarisiert, sondern nehmen zahlreiche verschiedene Polarisationsgrade in der Molekülebene ein.

Die Übereinstimmung zwischen berechneten und gemessenen Übergangsenergien und -intensitäten ist für die langwelligen Bereiche befriedigend, für die kurzwelligen weniger gut. Man könnte nun geneigt sein, bei der Diskussion der Spektren eine Analogie zu den 1L_a - und 1L_b -Banden des Anthrazens zu sehen, die (s.o.) senkrecht zu einander polarisiert sind.

Außerdem sollte der kurzwellige Übergang der Aminoacridine, welcher im Anthrazen 1B_b -Charakter besitzt, eine ähnliche Polarisierung wie die langwellige 1L_b -Bande zeigen.

Obwohl nun die experimentellen Polarisationspektren dieser Verbindungen eine solche Zuordnung nahelegen würden, welcher auch die quantenchemischen Rechnungen bei großzügiger Fassung der Interpretation nicht widersprechen würden, muß an dieser Stelle eher zurückhaltend gedeutet werden. Durch die Aminogruppe und das Heterostickstoffatom wird das Elektronengebäude im Vergleich zum Anthrazen so sehr verändert, daß eine Korrelation der Banden auf der Basis der Übergangsladungsverteilungen nicht mehr gegeben ist (siehe auch W. Seiffert et al. 98).

Die Messungen an diesen Verbindungen haben indessen erkennen lassen, daß die beiden langwelligen Absorptionsbanden zumindest sehr unterschiedlich polarisiert sind.

Dieser Befund (Tabellen 4 und 7) konnte insbesondere bei der Berechnung der Spektren von 2-A-7-Met-9-MeA wiedergegeben werden.

Bei 2-AA (Tabellen 2 und 5) hingegen konnte der gemessene Verlauf der Polarisierung der Absorption durch die SCF-Rechnungen nicht befriedigend wiedergegeben werden.

Tabelle 2 : 2-Aminoacridin

Zustand	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S ₇	S ₈	S ₉	S ₁₀
Energie(KK)	24,1	28,8	33,8	30,3	37,8	39,8	43,3	44,9	45,9	49,7
Oszill.stärke	0,28	0,08	0,29	0,36	1,63	0,16	0,01	0,45	0,19	0,4
Polarisation										
M _K	-0,65	-0,50	-0,34	+0,25	+0,92	+0,55	0,56	0,77	0,38	+0,42
M _L	-0,75	-0,85	+0,88	+0,86	+0,01	+0,42	-0,38	+0,47	+0,21	-0,5

Abb. 11 a-c: berechnete π -Bindungslängen(a), π -Bindungsordnungen(b)
 π -Elektronendichten(c) des 2-AA

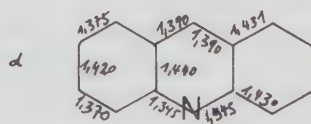
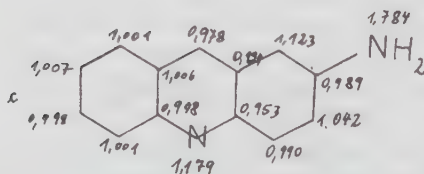
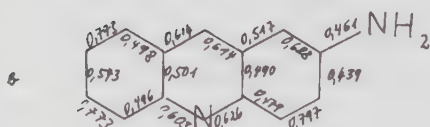
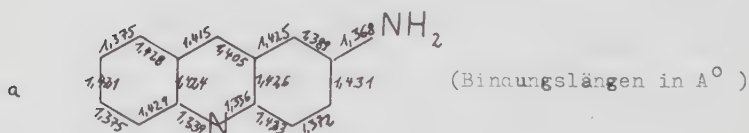
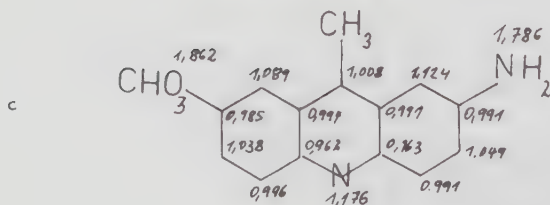
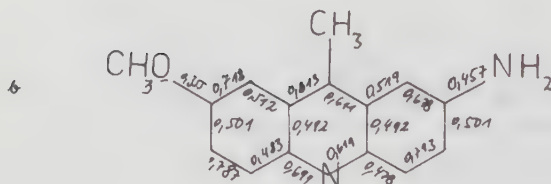
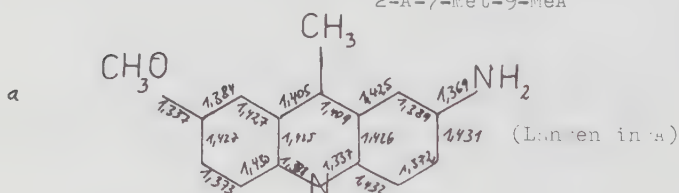


Abb. 11d: Geometrie der Acridinbase nach D.Phillipps(75)
zum Vergleich, Abstände in Å°.

Distance	s_1	s_2	s_3	s_4	s_5	s_6	s_7	s_8	s_9	s_{10}
energie(keV)	24,6	26,3	32,7	35,3	37,8	38,1	40,8	42,6	45,9	47,1
abs. count rate	0,27	0,216	0,55	0,06	0,14	1,78	0,03	0,46	0,03	0,0
polarisation										
M_X	+0,62	+0,24	0,44	0,78	0,99	0,99	0,01	0,02	0,4	0,4
M_Y	-0,36	+0,84	-0,54	+0,32	+0,01	+0,02	+0,91	-0,89	+0,5	-0,6

Abb. 13 a - c: berechnete π -Bindungslassen(a), π -Bindungsordnungen(b) und π -Elektronendichten(c) von 2-A-7-Met-9-MeA



Im wesentlichen übereinstimmend zum Experiment wird die Polarisierung der UV-Bande stärkster Intensität in der SCF-Rechnung zu der der langwelligen Absorption vergleichbar erhalten: Diese Bande ist in der langen Molekülachse polarisiert.

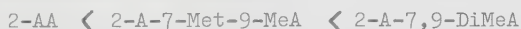
Aus den Moleküldiagrammen (Abb. 11-16a-c) sind weitere Angaben zu entnehmen:

Die π -Elektronendichte nimmt am Ringstickstoff N_{10} der Basen (Tabellen 11-13c) von durchschnittlich 1,18 Elementarladungen (El) auf 1,69 El in den Kationen (Tab.14-16c) zu.

Die effektive Überschußladung an N_{10} ändert sich somit von -0,18 El auf +0,69 El. Der Ladungsrest von +0,31 El verteilt sich ohne eine erkennbare Regelmäßigkeit auf das gesamte

π -System des Kations.

Die Elektronendichte am Heterostickstoffatom N_{10} steht in Beziehung zu den pK_s -Werten dieser Verbindungen. Dieselben wurden bestimmt, worüber später berichtet wird (S. 59f.). Obwohl nun die Absolutbeträge der elektronischen Effekte sehr gering sind, ergibt sich aus den Rechenergebnissen in Übereinstimmung zu den gemessenen pK_s -Werten eine qualitativ richtige Abfolge der Basizitäten dieser Verbindungen: Nach steigenden Basizitäten gilt:



Die nach Dewar und Gleicher berechneten SCF-Geometrien korrelieren zu den C-C- und C-N- Bindungslängen des Experimentes, siehe Abb.11d.

Wie im theoretischen Teil schon ausgeführt, können die Übergangsenergien mit oder ohne "R-Variationsrechnung" erhalten werden. Die vorliegenden Untersuchungen ergaben mit R-Variation eine mäßige Verbesserung der langwelligen Übergänge im Vergleich zum Experiment, während die kurzwelligen Übergänge nicht grundsätzlich genauer waren als eine Berechnung ohne R-Variation. Die hier diskutierten Ergebnisse beziehen sich auf eine Rechnung mit R-Variation und zusätzlicher Berücksichtigung möglichst vieler Konfigurationen.

Tabelle 5: 2-Aminoacridin, erste Protonierungsstufe

Parameter	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S ₇	S ₈	S ₉	S ₁₀
Energie (kcal)	19,9	26,6	27,7	36,6	37,9	39,9	42,5	46,2	46,9	49,7
Übergangswerte	0,25	0,31	0,38	0,24	0,22	0,88	0,30	0,02	0,55	0,37
Polarisation										
M_X	0,68	0,99	0,98	0,23	0,24	0,89	-0,24	+0,03	-0,77	+0,56
M_Y	0,19	0,10	-0,12	+0,08	-0,59	+0,24	-0,12	-0,07	-0,80	+0,49

Abb. 14 a-c: Berechnete σ -Bindungslängen, π -Bindungsordnungen(b), π -Elektronendichten(c).

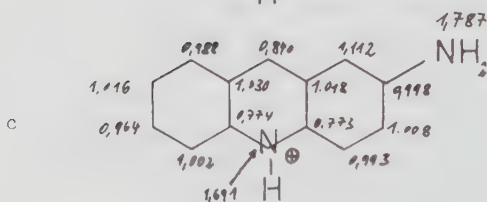
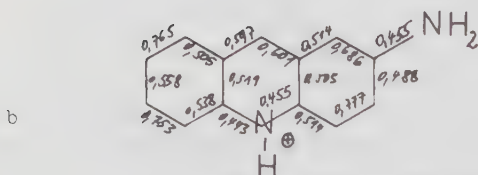
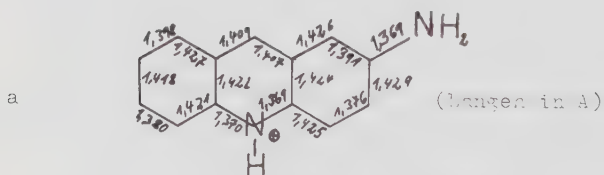


Tabelle 6 : 2-Amino-7,9-dimethylacridin, Monokation

Zustand	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S ₇	S ₈	S ₉	S ₁₀
Energie(kK)	19,9	26,6	29,7	36,6	37,9	39,5	42,9	46,2	46,9	49,7
Osz.starke	0,26	0,28	0,36	0,36	0,16	0,91	0,03	0,02	0,54	0,38
Polarisation										
M _X	0,62	0,55	0,42	0,64	0,27	0,80	0,44	0,09	0,45	0,39
M _Y	-0,34	+0,55	+0,64	+0,42	-0,76	-0,01	+0,64	+0,51	+0,55	+0,57

Abb. 7 a-c: Berechnete π -Bindungslängen(a) , π -Bindungsordnungen(b) , π -Elektronendichten(c).

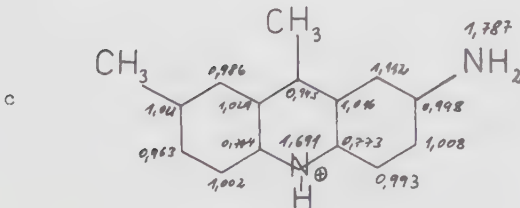
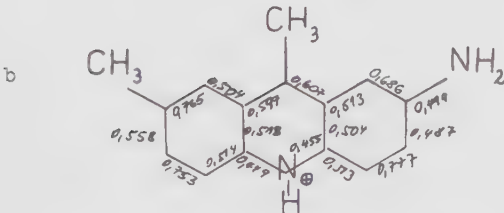
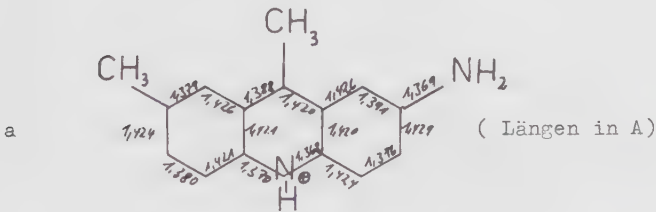
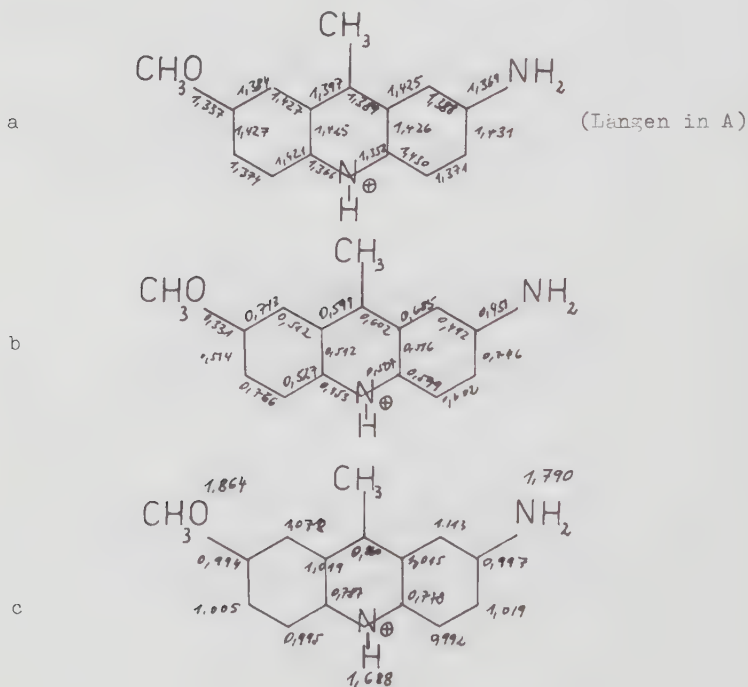


Tabelle 7 : 2-Amino-7-methoxy-9-methylacridin, Monokation

Zustand	S	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S ₇	S ₈	S ₉	S ₁₀
Energie(kK)	20,4	22,5	29,9	35,9	38,9	40,7	42,5	46,2	48,1	49,5
Osz.stärke	0,26	0,28	0,36	0,09	0,69	0,24	0,44	0,16	0,24	0,33
polarisation <i>M_x</i>	0,33	0,34	0,92	0,66	0,86	0,77	0,50	0,58	0,31	0,4
<i>M_y</i>	0,78-0,72	0,11	0,47	0,21	0,01	0,50-0,39	+0,71	+0,66		

Abb. 16 a-c: Berechnete π -Bindungslängen(a), π -Bindungsordnungen(b)
 π -Elektronendichten des Monokations des
 2-A-7-Met-9-MeA.



1.4.2.3 SCF-CI-Rechnungen an Diaminoverbindungen

Wie aus der Symmetriegruppe C_{2v} dieser Verbindungen hervorgeht, können die Polarisationen der Übergangsladungsverteilungen nur in der langen und kurzen Molekülachse orientiert sein. Allgemeiner Aspekt der vorliegenden Ergebnisse (Tabellen 8-11) ist:

Der gemessene Verlauf der Spektren wird in der PPP-Näherung realistisch wiedergegeben. Es werden allerdings wie schon bei den Monoaminoacridinen die kurzwelligen Übergänge als zu energiereich berechnet.

Die π -Elektronendichten und π -Bindungslängen korrelieren zu den experimentellen Befunden Molekülgeometrie und Basizitäten gut (Abb.17-20).

Die Struktur der langwelligen Absorption und der zugehörigen Fluoreszenzbande dieser Moleküle fordert besonderes Interesse: Wie schon experimentell erkannt, müssen im Bereich der Farb- bande zwei dicht benachbarte Übergänge existieren, welche beide für die Fluoreszenz verantwortlich sein können.

Der Verlauf der APF- und FP- Spektren könnte diese Interpretation stützen. Die quantenchemischen Rechenergebnisse zeigen nun tatsächlich für die Basen und Monokationen dieser Moleküle im Bereich der längstwelligen Absorptionsbande zwei dicht benachbarte, jedoch nicht entartete Übergänge $S_0 \rightarrow S_1$ und $S_0 \rightarrow S_2$: Ein Übergang starker Intensität, in der langen Molekülachse polarisiert, liegt unmittelbar neben einem solchen von schwächerer Intensität, welcher in der kurzen Molekülachse polarisiert ist.

Vergleicht man nun die langwelligen Absorptionsbereiche des Acridins mit seinen Mono- und Diaminoderivaten, läßt sich folgendes gesichert aussagen (Abb.21): Der langwellige Absorptionsbereich vor dem Anstieg zur UV-Bande wird in der SCF-CI-Betrachtung durch Übergänge $S_0 \rightarrow S_1$ und $S_0 \rightarrow S_2$ beschrieben. Rechenergebnisse und Experiment zeigen hierfür einen weitgehend übereinstimmenden Verlauf der Polarisationen dieser Absorptionsoszillatoren.

Tabelle 8 : 2,7-Diaminoacridin

Zustand	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S ₇	S ₈	S ₉	S ₁₀
Energie(kk)	24,8	24,9	32,5	34,6	37,3	37,9	40,9	41,9	45,7	45,9
Osz.Stärke	0,55	0,18	0,68	0,04	0,01	1,77	0,04	0,04	0,10	0,20
Symmetrie	B ₂	A ₁	B ₂	A ₁	B ₂	B ₂	A ₁	A ₁	B ₂	A ₁

Abb.17 : Berechnete π -Bindungslängen(a) , π -Bindungsordnung(b),
 π -Elektronendichten(c) des 2,7-DiAA .

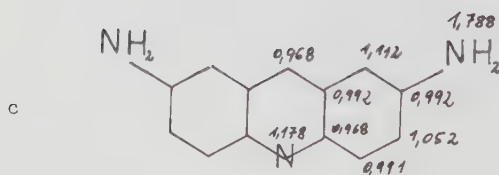
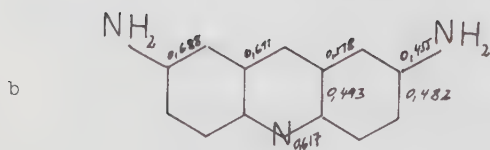
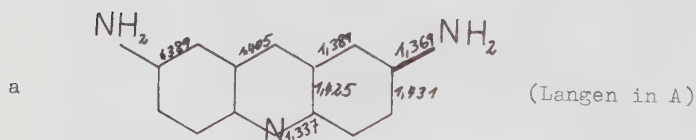


Tabelle 9 : 2,7-Diamino-9-methylacridin

Zustand	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S ₇	S ₈	S ₉	S ₁₀
Energie(kk)	24,7	24,8	32,2	34,6	37,3	37,9	40,9	41,9	45,7	45,9
Osz.Stärke	0,34	0,18	0,61	0,04	0,01	1,77	0,04	0,45	0,09	0,07
Symmetrie	B ₂	A ₁	B ₂	A ₁	B ₂	B ₂	A ₁	A ₁	B ₂	A ₁

Abb. 18 a-c : Berechnete π -Bindungslängen(a), π -Bindungsordnungen(b), π -Elektronendichten(c) des 2,7-DiA-9-MeA.

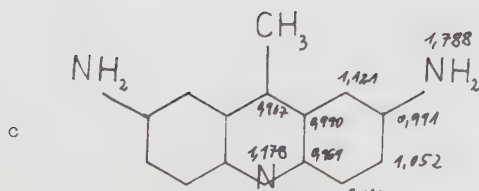
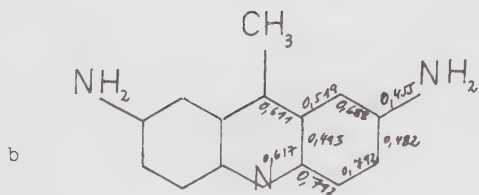
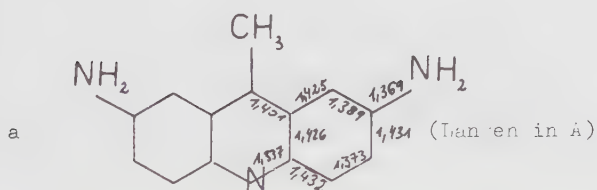


Tabelle 10: 2,7-Diaminoacridin, erste Protonierungsstufe

Abstand	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S ₇	S ₈	S ₉	S ₁₀
Abstände (Å)	20,7	20,8	30,0	35,4	37,3	38,0	39,9	41,5	46,4	47,7
U.z. Stärke	0,11	0,13	0,35	0,02	1,25	0,06	0,56	0,14	0,15	0,31
Symmetrie	B ₂	A ₁	B ₂	A ₁	B ₂	A ₁	B ₂	A ₁	B ₂	A ₁

Abb. 19 a-c : Berechnete π -Bindungslängen(a), Bindungsordnungen(b), π -Elektronendichten(c) des 2,7-DIAMonokations.

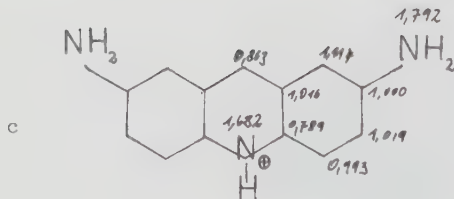
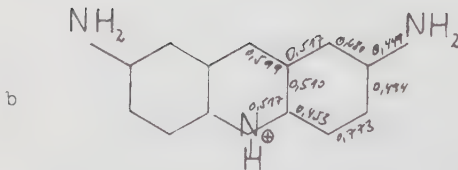
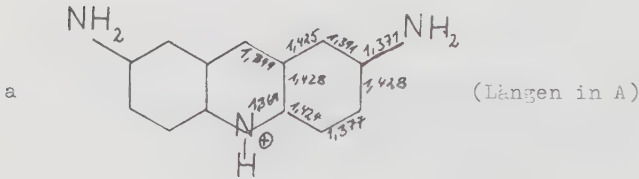


Tabelle 11: 2,7-Diamino-9-methylacridin, Monokation

Zustand	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S ₇	S ₈	S ₉	S ₁₀
Energie(kk)	20,6	20,6	29,9	35,4	37,2	37,9	39,8	41,4	46,3	46,6
Osz.stärke	0,13	0,41	0,35	0,01	1,25	0,06	0,56	0,14	0,15	0,31
Symmetrie	A ₁	B ₂	B ₂	A ₁	B ₂	A ₁	B ₂	A ₁	B ₂	A ₁

Abb. 20 a-c : berechnete π -Bindungslängen(a), π -Bindungsordnungen(b),
 π -Elektronendichten des Monokations von
 2,7-DiA-9-MeA.

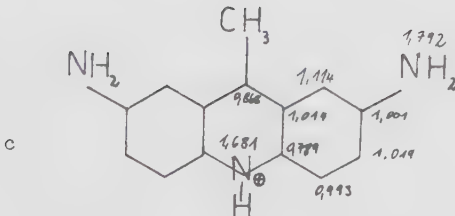
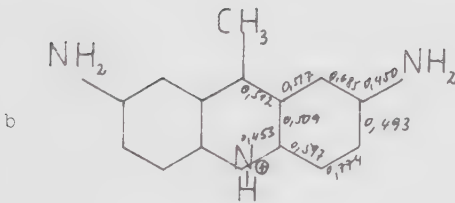
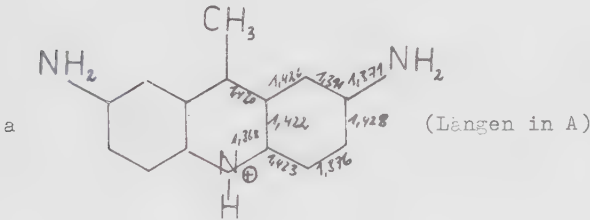
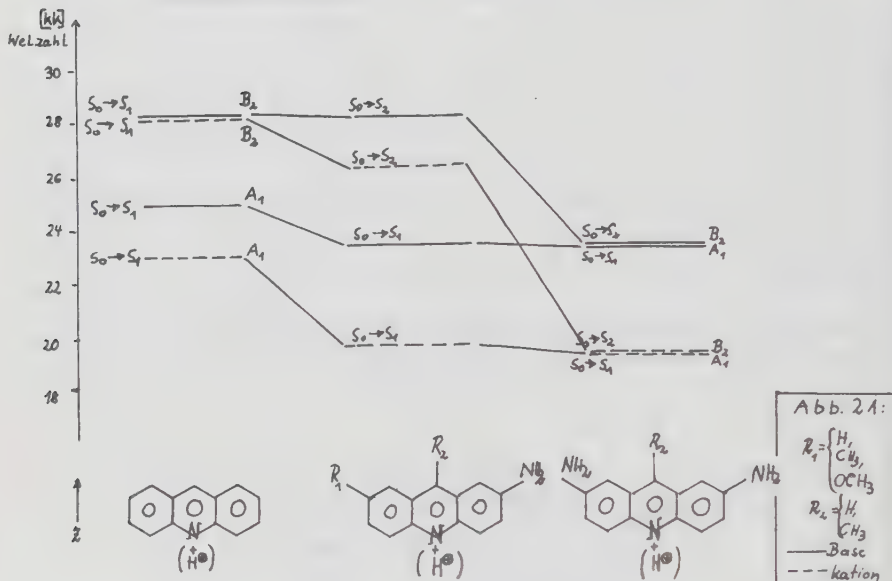


Abb. 21: Korrelation der beiden ersten Elektronensingulett-
übergänge des Acridins und seiner Mono- und
Diaminoderivate.



Bei den Diaminoacridinen rücken diese Übergänge so nahe zusammen, daß sie experimentell nur am deutlichen Sprung des Polarisationsgradspektrum differenziert werden können: Die Polarisierung der intensitätsstarken Bande kann die der schwächeren nicht unterdrücken, weil die Intensitätsunterschiede der beiden Absorptionssoszillatoren nicht zu groß sind. Aus den Fluoreszenzspektren läßt sich ein bemerkenswerter Befund erheben, welcher beim Kation des 2,7-DiAA am deutlichsten zu beobachten ist: Dem Maximum der Fluoreszenzintensität entspricht ein Minimum im FP-Spektrum, welches den gleichen Polarisationsgrad aufweist wie der Absorptionssoszillator bei $\tilde{\nu}_A$, in den zur Fluoreszenzanregung eingestrahlt worden ist. Da diesem Absorptionssoszillator nach der vorstehenden Diskussion eine Polarisierung in der langen Molekülachse zukommt, muß das gleiche für das Maximum der Fluoreszenzbande gelten.

Dem Anstieg des FP-Spektrums zu beiden Seiten seines Minimums entsprechen dann Anteile des Fluoreszenzspektrums, die aus Symmetriegründen in der kurzen Molekülachse polarisiert sind. Sie weisen somit die gleiche Polarisierung auf wie die Anteile der langwelligen Absorptionsbande, welche sich als Schulter mit geringer Extinktion messen lassen. Zur entgeltigen Sicherung dieses Befundes sind weiterführende Untersuchungen notwendig, bei welchen die Abhängigkeit von Intensität und Polarisierung des Fluoreszenzlichtes von der Erregerwellenlänge λ zu messen sind.

Mit der gebotenen Vorsicht läßt sich bereits jetzt aus dem vorliegenden experimentellen Material der Schluß ziehen, daß die Fluoreszenz dieser Moleküle aus zwei dicht benachbarten Elektronenbanden erfolgt.

Die Berechnung der energiereichen UV-Übergänge führt auf Polarisationsgrade, welche dem des intensitätsstarken langwelligen Übergangs gleichkommen! Der experimentelle Verlauf wird somit richtig wiedergegeben. Damit weisen aber die untersuchten Diaminoacridine ziemlich übereinstimmende elektronenspektroskopische Eigenschaften auf.

1.4.3 Messungen bei Normaltemperatur

1.4.3.1 Zur Frage des Ortes der Protonierung des Acridins und seiner Aminoderivate

Die Protonierung des Acridins erfolgt eindeutig am Stickstoffatom des Ringes. Es wird das einsame Elektronenpaar zur Protonierung zur Verfügung gestellt.

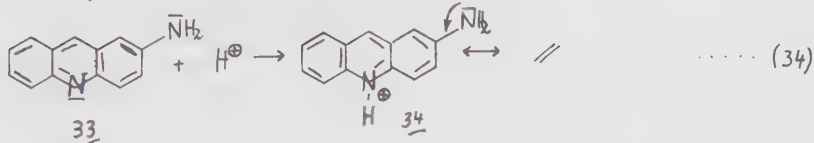
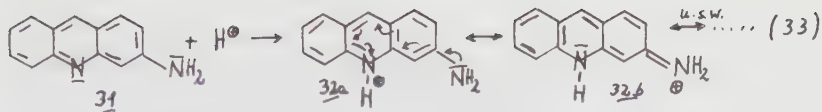


Die Protonierung kann spektroskopisch verfolgt werden, der auf diesem Wege bestimmte pK_s -Wert beträgt bei 20°C $pK_s^{20} = 5,6$ (98,129).

Die Einführung von Substituenten bewirkt Veränderungen im Elektrongegebäude, Änderungen der pK_s -Werte sind die Folge. I- und M-Effekte der Substituenten können diskutiert und nach C. K. Ingold (40) im Valence-Bond-Bild (VB) als Anteile innermolekularer Polarisierung beschrieben werden.

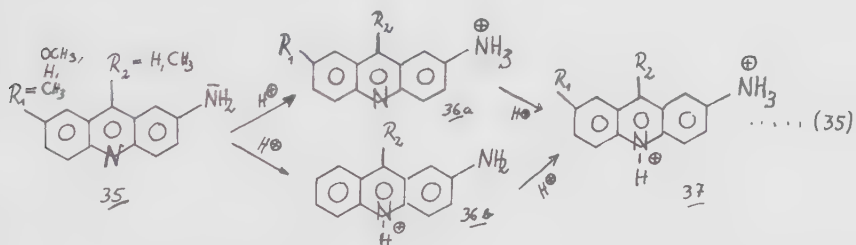
Entsprechende "Valenzstrichformeln" können für die Verbindungen angegeben werden. Im MO-Modell werden I-Effekte vor allem im Operator des Molekülgerüsts erfaßbar, während mesomere Effekte durch entsprechende Konfigurationen (Gl.12) darstellbar sein sollten.

Bei Protonierung des 5-Aminoacridins 31 entsteht das Molekül 32a, an dessen Grundzustand u.a. die Grenzstrukturen 32a und 32b stark beteiligt sind. Die positive Ladung wird über einen großen Bereich verteilt, die Basizität ist entsprechend hoch. Demgegenüber ist bei der protonierten Verbindung 34 eine Übernahme der positiven Überschußladung im Sinne einer entsprechenden energiearmen Grenzstruktur nicht möglich. Die positive Ladung bleibt weitgehend am Ringstickstoff lokalisiert. Die Verbindung 33 ist wesentlich weniger basisch als 31. Die Delokalisierung der positiven Ladung auf energetisch ungünstige Grenzstrukturen findet nicht statt.



Die in dieser Arbeit diskutierten Acridinderivate weisen Amino-, Methyl- und Methoxysubstituenten auf, sie werden mehrere Protonierungsstufen (mindestens zwei) spektroskopisch unterscheiden lassen.

Es erhebt sich daher die Frage, in welcher Reihenfolge die Stickstoffatome der Base die Wasserstoffionen bei Protonierung binden. Für die Gruppe der 2-Aminoacridine lassen sich folgende Protonierungsstufen formulieren, die spektroskopisch unterscheidbar sein sollten:

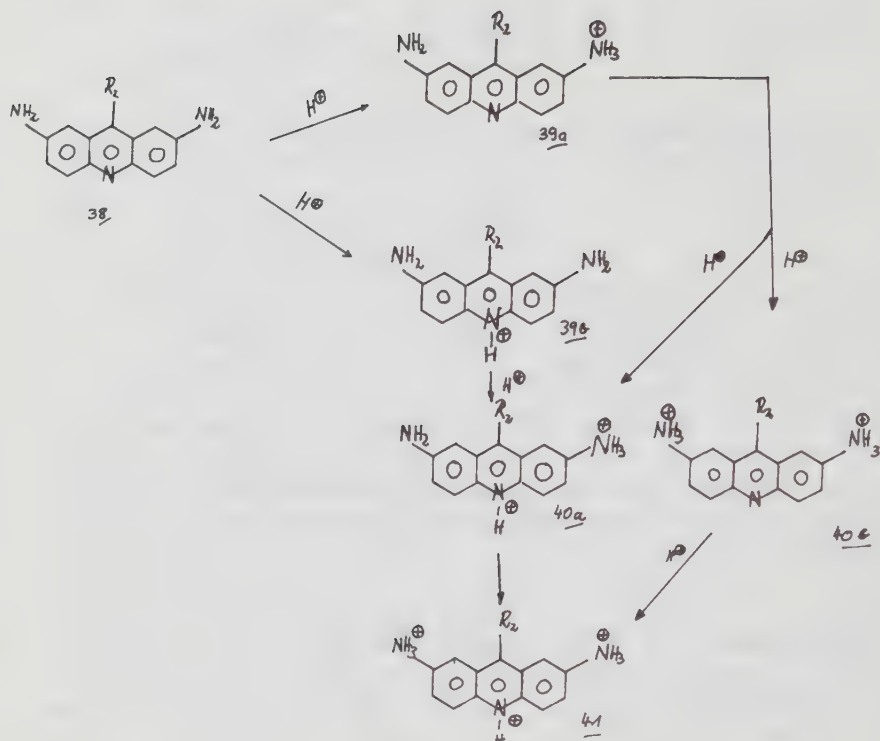


Das Spektrum der Stammverbindung 35 unterscheidet sich als Aminoderivat von dem des Acridins. Die erste Protonierungsstufe von 35 sollte im Falle 36a ein Spektrum besitzen, das dem der Acridinbase gleicht, weil die Protonierung der Seitenkette in 36a ein π -System erzeugen würde, in welchem keine Mesomerie mehr zwischen Ring und Substituent besteht.

Demgegenüber läßt sich für 36b ein Spektrum erhoffen, welches dem von 34 weitgehend gleicht; es wird zu dem von 33 (im wesentlichen) um einen bestimmten Betrag bathochrom verschobene Banden erkennen lassen.

Bei doppelter Protonierung gehen 36a und 36b in 37 über. Dessen Spektrum nun steht in Analogie zu dem des Kations des Acridingrundkörpers 30b.

Eine entsprechende Argumentation gilt für die Spektren der Diaminoderivate des Acridins.



Das Spektrum des Diaminoacridinderivates 38 unterscheidet sich qualitativ ebenfalls von dem der Acridinbase. Alle Banden sind charakteristisch bathochrom verschoben. Die erste Protonierung führt entweder zu 39a oder 39b. Das Spektrum von 39a sollte 35 und damit 33 ähnlich sein. Demgegenüber sollte 39b ein gegenüber 38 rotverschobenes Spektrum zeigen. Die zweite Protonierungsstufe läßt für 40a eine Analogie zu 36b erwarten, 40b hingegen ließe sich daran erkennen, daß sein Spektrum wieder dem von 30 gleicht. Die dritte Protonierung schließlich führt zum gemeinsamen Endprodukt 41. Dessen Spektrum sollte zu 37 und somit zu 30b, dem Acridiniumkation, vergleichbar sein.

1.4.3.2. Messung der pK_s -Werte und Zuordnung zu den basischen Zentren der Verbindungen

Für zahlreiche Acridinderivate einschließlich dem Grundkörper wurden die pK_s -Werte schon gemessen und tabelliert. Die Methode der spektroskopischen Bestimmung von Säure-Base-Gleichgewichten ist lange bekannt und braucht hier nicht mehr wiederholt werden, Albert et al. und andere Autoren(1,3,9,27). Die nachfolgenden pK_s -Werte wurden in einem Veronal-acetat-HCl-Puffer bestimmt, siehe auch biologischer Teil der Arbeit, S.67ff. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 21 und 22 aufgeführt.

Tabelle 21: isosbestische Punkte und analytische Wellenlängen (KK)

	isosbest.Punkte	anal.Wellenlänge
2-AA	23,5(26,4)	21,7
2-A-7,9-DiMeA	23,4(25,0/27,4)	21,7 (24,7)
2-A-7-Met-9-MeA	23,2(26,3)	22,0
2,7-DiAA	25,5(27,1)	22,0 (24,2)
2,7-DiA-9-MeA	25,3(27,0)	22,1 (25,5)

Tabelle 22: pK_s -Werte der ersten Protonierungsstufe (Veronal-Acetat-HCl-puffer)

	20°C	37°C
2-AA	5,9	5,6
2-A-7,9-DiMeA	6,3	6,0
2-A-7-Met-9-MeA	6,1	5,8
2,7-DiAA	6,2	5,9
2,7-DiA-9-MeA	6,5	6,2
zum Vergleich(1)		
Acridin	5,6	5,3
2-A-9-MeA	6,1	5,8

Die Werte bei 37°C (Incubationstemperatur) wurden extrapoliert. Aus zahlreichen Arbeiten wurde für die Temperaturabhängigkeit des pK_s -Wertes der ersten Protonierungsstufe ein mittlerer Wert von -0,3 Einheiten für die Temperaturdifferenz von 17°C bestimmt.

Wie die Ergebnisse in Tabelle 22 zeigen, verhalten sich die pK_s -Werte der ersten Protonierungsstufe der geprüften Verbindungen additiv im Bezug auf die Substitution am Grundkörper Acridin: Eine 2-Aminogruppe erhöht den $1.pK_s$ -Wert um 0,3, eine 2- oder 7-Methylgruppe um 0,2, eine 9-Methylgruppe um 0,3 Einheiten. Eine 2- oder 7-Methoxygruppe senkt den $1.pK_s$ -Wert um 0,1 Einheiten. 2,7-DiA-9-MeA besitzt somit einen $1.pK_s$ -Werte bei 20°C von 6,5: $5,6 + 2 \cdot 0,3 + 0,3$! Für 2-A-7-Met-9-MeA gilt übereinstimmend: $6,1 = 5,6 + 0,3 - 0,1 + 0,3$!

Die pK_s -Werte der zweiten und dritten Protonierungsstufe wurden nicht mehr bestimmt, da sie physiologisch ohne Bedeutung sind. Es wurden nur einige ergänzende Spektren bei 20°C für die pH-Werte 3,45/2,33/1,33/ 5N HCl und konz. H_2SO_4 gemessen, welche genügend Informationen boten, um den Ablauf der 2.- und 3. Protonierung verfolgen zu können: Bei den Monoaminoacridinen, wie durch 35 symbolisiert, beobachtet man in 5N HCl und H_2SO_4 (konz.) eine Absorption, die nach Lage und Aussehen dem Spektrum eines Kations des AcridinGrundkörpers, 30b, gleicht. Das Spektrum muß also einer Verbindung 37 zukommen. Es ist noch bei pH 1,33 zu beobachten. Bei pH 2,33 ist ein Mischspektrum zu beobachten, welches sich bei pH 3,45 nach Lage und Aussehen wieder eindeutig von dem in konzentrierter Säure abhebt. Oberhalb von pH 7 bleibt dieses Spektrum unverändert. Es muß also einer Verbindung 35 zukommen. Das Spektrum bei pH 3,45 ist damit eindeutig einer Verbindung des Typs 36b zuzuordnen.

Bei den Diaminoderivaten kann in 5 N HCl und H_2SO_4 analoges gemessen werden: Es liegt jetzt das Spektrum einer vollständig protonierten Spezies vor, 41. Dieses gleicht 37 bzw. 30b. Genauso wird bei pH 2,33 und 3,45 ein Spektrum gemessen, welches seine Banden oberhalb pH 7,5 nicht mehr verändert. Folglich wurden Spektren der Spezies 38 und 39b gemessen. Schließlich zeigt sich bei pH 1,33 ein Spektrum, welches sich von dem der Spezies 38 und 39b abhebt und dem von 36b gleicht.

Dies aber stellt die zweifach protonierte Spezies 40a dar.

In der Tabelle 23 sind diese Befunde zusammengefasst. Es zeigt sich also: Bei diesen Verbindungen wird als Zentrum stärkster

Tabelle 23: Protonierung der Acridinderivate			
	erstes Proton	zweites Proton	drittes Proton
2-AA	king-N ₁₀	Amino-N ₁₅	-
2-A-7,9-DiMeA	"	"	-
2-A-7-Met-9-MeA	"	"	-
2,7-DiAA	"	"	Amino-N ₁₆
2,7-DiA-9-MeA	"	"	"

Basizität das Stickstoffatom des Heterozyklus zuerst protoniert. Mit steigender Acidität (pH < 2) erfolgt auch die Protonierung der Aminogruppen in den Seitenketten. Vergleicht man diese Basizitäten mit denjenigen der 3,6- und 9-substituierten Verbindungen, muß folgendes angemerkt werden:

Die pK_s-Werte der ersten Protonierungsstufe liegen bei den zuletzt genannten, bis heute praktisch ausnahmslos in der Cytologie verwendeten Verbindungen deutlich über dem physiologisch wichtigen Werte 7,2. Bei 20°C gelten folgende Werte, die bei 37°C um die schon erläuterten 0,3 Einheiten zu erniedrigen sind: 3-AA 8,04 / 3,6-DiAA 9,65 / AO 10,2 / Atebrin 9,15 / 9-AA 10,05 (1,3,9,85,127). Das bekannte Fluorochrom AO liegt also in wässriger Phase über den gesamten, biologisch wichtigen pH-Bereich als (wenn auch assoziationsfähiges) Kation vor. Selbst bei 3-AA stehen bei pH 7,2 noch 88% Monokationen mit nur 12% Base im Lösungsgleichgewicht (nach 1, S. 444 f.). Die von uns hier untersuchten Acridinderivate stellen im Vergleich dazu deutlich schwächere Basen dar; bei pH 7,2 gilt: Die Monokationenkonzentration des 2,7-DiA-9-MeA beträgt bei 20°C 15%, bei 37°C nur 9,1% der gesamten Fs-konzentration. Für die hier geprüfte schwächste Base 2-AA lauten die Vergleichszahlen: Bei 20°C 4,8% Monokationen, bei 37°C 2,4% (pH 7,2). Bei den übrigen Verbindungen dieser Untersuchung liegt das Verhältnis Monokationen zu Basen zwischen diesen Werten.

Diese Daten besitzen große Bedeutung bei der Durchführung und Beurteilung der Incubations- und Färbeversuche im biologischen Teil der Arbeit, worüber die später folgenden Abschnitte dieser Arbeit berichten werden.

1.4.3.3 Zur Frage der Solvatochromie und Metachromasie der Aminoacridinderivate

Nachdem im zurückliegenden Teil der Arbeit schon eine Reihe wesentlicher, spektroskopisch zu prüfender Eigenschaften der Aminoacridinderivate diskutiert wurden, muß die Möglichkeit, biologische Versuche mit diesen Verbindungen mikroskopisch beurteilen zu können, notwendigerweise auch durch einen Antwortversuch auf die hier gestellte Frage ergänzt werden. Denn nahezu alle Substanzen zeigen nach dem heutigen Stand der Kenntnisse eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Solvatochromie. Metachromasie hingegen wird seltener beobachtet. Strenge Orthochromasie wird bei Substanzen nur dann beobachtet, wenn deren Elektronenspektren unabhängig von der Konzentration und Solvathülle sind. Daß diese Bedingung nur bei großzügiger Interpretation vieler Spektren erfüllbar ist, wurde schon in Kap. III (S.6ff.) dieser Arbeit erwähnt.

Bei den wichtigen Farbstoffen Methylenblau, AO und Pseudoisocyanin z. B. beobachtet man eine ausgeprägte Metachromasie. Als Beispiel für ein stark solvatochromes Molekül seien Aminophenanthridine wie Ethidium-bromid genannt (I. Zimmermann, 131). Um die Solvatochromie der hier untersuchten Verbindungen vorläufig zu prüfen, wurden Normaltemperaturspektren in Alkohol, Alkoholpuffergemischen und wässrigen Pufferlösungen gemessen.

Farbbasen wie Monokationen wurden bei einer Konzentration von 10^{-4} m untersucht. Ergebnis: Beim Übergang von Alkohol zu wässrigen Pufferlösungen beobachtet man bei den Monoaminoacridinen 2-AA, 2-A-7,9-DiMeA und 2-A-7-Met-9-MeA eine kurzwellige Verschiebung der Banden um ca. 2 KK, bei den Diaminoacridinen 2,7-DiAA und 2,7-DiA-9-MeA eine solche um ca. 1 KK. Die Substanzen sind damit solvatochrom.

Für die noch folgenden mikroskopischen Untersuchungen mag dabei wesentlich sein:

Im Bezug auf die subjektive Wahrnehmung der Fluoreszenzfarben kann die Farbänderung durch solvatochrome Effekte nicht als erheblich betrachtet werden, denn die Farben der Fluorochrombasen bleiben im grüngelben, die der Monokationen im rotorangen Farbtonbereich.

Weiterführende Untersuchungen wurden an dieser Stelle zunächst nicht durchgeführt.

Um nun die Metachromasie (Konzentrationsabhängigkeit) der Spektren dieser Fluorochrome zu überprüfen, wurden Lösungen der Basen bei pH 8,5 im Konzentrationsbereich $5 \cdot 10^{-4}$ m bis $5 \cdot 10^{-6}$ m, Lösungen der Kationen bei pH 4,35 im Konzentrationsbereich $5 \cdot 10^{-3}$ m bis 10^{-6} m spektroskopiert.

Ergebnis: Die Spektren zeigen in den genannten Bereichen keine Konzentrationsabhängigkeit. Somit darf auch keine mit vorliegenden spektroskopischen Mitteln meßbare Assoziation dieser Verbindungen angenommen werden. Die Substanzen müssen nach den vorliegenden Messungen einerseits bezüglich Lösungsmittelfeffekten als solvatochrome, andererseits im Bezug auf die Konzentrationsabhängigkeit der Spektren als orthochromatische Fluorochrome klassifiziert werden.

Ob dies noch gültig ist, wenn man den Lösungen Biopolymere (Chromotrope) hinzufügt, soll im folgenden Abschnitt untersucht werden.

Für Lösungsspektren kommen als Chromotrope u.a. in Frage: Mucopolysaccharide, Chondroitinsulfat, Nukleinsäuren (DNA, RNA). Unter diesen muß vor allem den Nukleinsäuren besonderes Interesse zukommen. (95,96,107)

In einer ersten orientierenden Studie, die ohne Zweifel ergänzungsbedürftig sein muß, haben wir folgende Lösungen aus Fs und Chromotropen untersucht:

Basen bei pH 7,5 und Monokationen bei pH 4,35, Konzentrationen 10^{-5} m und 10^{-4} m, wurden in Veronal-acetat-HCl-puffer (0,05 m) mit Nukleinsäuren versetzt (0,1 gr% entsprechend ca. $5 \cdot 10^{-3}$ m bezüglich der Phosphatgruppen, Arbeitsvorschriften siehe praktischer Teil, S.96). Diese Lösungsspektren wurden jeweils

den Spektren der reinen Fs-Lösungen gleicher Konzentration und gleichen pH-Wertes gegenübergestellt, Temperatur 20°C. In der folgenden Tabelle 24 sind die Meßergebnisse aufgeführt.

Tabelle 24: langwellige Absorption der reinen Fs-Lösungen (1) und der Lösungen nach Zugabe von RNA (2), DNA (3) sowie Fluoreszenzfarbe (4) von 2 und 3, bei 20°C

Anteil an RNA	1	2	3	4
2-AA	24,7/28,1	unverändert	unverändert	gelbbraun
2,7-DiAA	24,7/27,0	"	"	orangerot
2,7-DiAA	B 24,7/27,4	20,0/25,0	20,5/24,8	orangerot
2,7-DiAA	A 24,7/26,5	21,5/25,7	21,4/25,4	orangerot
2,7-DiAA	B 24,7/26,7	21,0/25,1	20,9/24,8	rot orange
2,7-DiAA	A 24,4/25,5	21,8/25,3	21,8/25,3	rotorange
2,7-DiAA	B 22(Schul.)25,0	unver.	unverand.	gelbgrün
2,7-DiAA	A 21,5 "/24,5	"	"	rotorange
2,7-DiAA	B 22(Schul.)25,0	20,4/22,9	20,5/24,9	orangerot
2,7-DiAA	A 21,5 "/24,4	20,5/24,4	20,5/24,4	rotorange

Wie ein Blick auf die Tab.24 lehrt, ist ein besonderer Befund zu erheben, der nach den bisher durchgeführten spektroskopischen Untersuchungen nicht vorauszusagen war. Die Spektren von 2-AA und 2,7-DiAA zeigen keine meßbare Reaktion bei Zugabe dieser Chromotrope, demgegenüber lassen sich bei der Gruppe der 9-methylsubstituierten Mono- und Diamino-acridinderivate 2-A-7,9-DiMeA, 2-A-7-Met-9-MeA und 2,7-DiA-9-MeA deutliche Veränderungen in den Spektren nachweisen:

Die Absorptions- und Fluoreszenzbanden dieser Verbindungen werden bei Chromotropzugabe erheblich bathochrom verschoben. Diese Beobachtung - eine noch zu interpretierende Reaktion der Fluorochrome mit den Nukleinsäuren - soll im folgenden "Nukleinsäurereaktion", NSR, genannt werden.

Was kann nun anhand der vorliegenden Meßergebnisse über diese NSR gesagt werden?

Bei pH 7,5 werden in Lösungen, die ein 9-Methylacridinderivat und Nukleinsäure enthalten, Spektren gemessen, die nicht den Fluorochrombasen zugeordnet werden können, sondern nach Lage und Aussehen der Banden als langwellig verschobene Spektren der Kationen aufzufassen sind. Vermisst man Lösungen bei pH 4,35, welche entsprechend Monokationen enthalten, so verursacht dieselbe Nukleinsäurezugabe eine geringere, jedoch immer noch deutlich meßbare bathochrome Verschiebung der Banden. Diese Verschiebung beträgt (je nach Verbindung) 0,2 - 1,1 KK bezogen auf die reinen Kationen und 2 - 3,8 KK bezogen auf die Moleküle der reinen Fs-Basen.

Zusätzliche Angaben über Eigenschaften vergleichbarer Poly-anionen sind für die weitere Diskussion nützlich: PK_s -Werte von Nukleinsäuren verschiedener Herkunft (18,36,108) und Polyphosphorsäuren unterschiedlichen Polymerisationsgrades (96) zeigen, daß die Acidität der hier wichtigen Phosphatgruppe der Nukleinsäuren mit gutem Grund der einer primären Phosphatgruppe von H_3PO_4 gleichgesetzt werden darf. Der dieser Gruppe zugehörige Wert 2,1 (20°C) weist aus, daß bei pH 4,35 sowie 7,5 alle primären Phosphatgruppen dissoziiert sind. Dadurch sind sie bei den vorliegenden Meßbedingungen zu einer coulombschen Wechselwirkung befähigt.

Zu den Monokationen von 2-AA und 2,7-DiAA erfolgt bei pH 4,35 durch diese Chromotrope allein eine lockere elektrostatische Wechselwirkung, vergleichbar einer salzartigen Bindung.

Es wird daher bei diesem pH ein praktisch ungestörtes Spektrum der Monokationen dieser Verbindungen gemessen. Bei pH 7,5 liegen die Nukleinsäuren immer noch als Polyanionen vor, die Fs aber als Basen, welche nicht mehr durch Coulombkräfte an die DNS-bzw. RNS-Anionen gebunden werden. Folglich sind die ungestörten Spektren der Farbbasen zu beobachten. Die Verbindungen 2-AA und 2,7-DiAA behalten also auch nach Wechselwirkung mit Nukleinsäurepolyanionen ihre orthochromatischen Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften bei.

Wesentlich anders verhalten sich die durch Einführung einer 9-Methylgruppe (tri)substituierten Acridinderivate: Obwohl diese Verbindungen durch die genannte Substitution nach den bis jetzt dargestellten Ergebnissen ihre spektroskopisch prüfbaren Eigenschaften im Vergleich zu den beiden zuvor genannten Verbindungen kaum geändert haben, ist der Einfluß der Trisubstitution jetzt so erheblich, daß Monokationen dieser Derivate bei sauren und alkalischen pH-Werten eine Wechselwirkung zu den Chromotropen DNA und RNA aufnehmen, welche den vorsichtigen Schluß nahelegt: Diese Verbindungen verlieren in Gegenwart der Chromotrope DNA und RNA ihre orthochromatischen Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften. Diese Beobachtung kann nicht nur im Sinne einer unspezifischen elektrostatischen Bindung wie bei 2-AA und 2,7-DiAA aufgefaßt werden, vielmehr deuten die Spektralveränderungen auf eine zusätzliche spezifische Wechselwirkung zwischen diesen Monokationen und den Nukleinsäuren, die man wie z.B. beim AO im Bilde des Intercalationsmodells von Lerman (51) zu interpretieren geneigt sein mag.

Die beobachteten Befunde sprechen nicht für eine Metachromasie als Folge einer Assoziation des Farbstoffs an diesen Biopolymeren.

An anderer Stelle wurde der Begriff "auswählende Solvatochromie" erörtert (131). Die Hypothese wird an dieser Stelle ausgesprochen, daß mit diesem Begriff die physikalisch-chemische Natur dieser Beobachtung besser interpretiert werden kann.

Weiterführende spektroskopische Untersuchungen werden hier mehr Klarheit schaffen und diese ersten Ergebnisse ergänzen.

Folgende Fragen werden zu klären sein:

- a) Zeigt diese spezifische NSR eine Abhängigkeit von der Basensequenz der Nukleinsäuren?
- b) Ist das Ausmaß der NSR außerhalb der hier gemessenen Konzentrationsbereiche abhängig von der Fs-Konzentration?
- c) Welches ist der quantitative Zusammenhang zwischen gebundenem und freiem Fs im Lösungsgleichgewicht?

Untersuchungen vergleichbarer Art wurden für eine Reihe von 3,6-disubstituierten Acridinderivate schon von Peacock (73), Schwarz (89) und Scatchard (90) veröffentlicht.

2. TEIL: BIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

2.1. Einleitung

Zu Beginn dieses Abschnittes der vorliegenden Arbeit werden die fluoreszenz- und phasenkontrastmikroskopisch beobachteten morphologischen Veränderungen an in Kultur gezüchteten Fibroblasten der Maus nach Vitalfluorochromierung durch die schon diskutierten Acridinderivate beschrieben. Daran anschließend wird gezeigt, daß die farbstoffabhängigen Variationen der zellulären Antwort auf die Vitalfärbung hin in dauerhaft fixierten Präparaten eine systematische Befunderhebung zulassen.

In der weiteren Folge wird über die pH-Abhängigkeit der Ergebnisse der Fluoreszenzfärbung im cytologischen Bereich berichtet : Hierzu sind in Kultur gewachsene, unvorbehandelte, fixierte Helazellen und wiederum Mäusefibroblasten die biologischen Substrate der Untersuchung. Danach endet der cytologische Teil der Arbeit.

Im histologischen Teil der Arbeit werden die mit den Aminoacridinen erhobenen cytologischen Befunde an ausgewählten, fixierten Organpräparaten von Ratte und Maus zusammenfassend überprüft.

In einer abschließenden Diskussion werden alle cytologischen und histologischen Befunde im Hinblick auf die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Fluorochrome gemeinsam bewertet.

Die Arbeitsvorschriften zu diesen Untersuchungen sind im im praktischen Teil zusammengestellt.

2.2. Cytologische Untersuchungen

2.2.1. Die Kontrollkulturen

Fibroblasten der Maus wurden unvorbehandelt in Kultur gezüchtet. Deren Struktur in vitalem wie fixiertem Zustand ist oft beschrieben worden. Sie braucht hier nicht mehr dargestellt zu werden (125). Regelmäßig treffen an ungefärbten Präparaten die folgenden wichtigsten phasenoptischen Befunde zu: Wenige Zellen enthalten Heterolysosomen, Reste phagocytierten Materials abgestorbener Zellen. Mitochondrien findet man als Stäbchen oder seltener kugelförmig. Das Cytoplasma enthält

unregelmäßig stark lichtbrechende einzelne oder in kleinen Gruppen liegende Fettröpfchen unterschiedlichen Durchmessers. Die Chromosomen von Zellen in Mitose sowie intracytoplasmatische Reste phagocytierter Zellen weisen nach Fixation meist eine schwache, bläulich weiße Primärfluoreszenz auf. Die Zellkerne enthalten häufig mehrere Nukleolen.

2.2.2 Vitalfluorochromierte Fibroblasten

Allgemeiner Befund: Lange Expositionszeiten des Farbstoffes, 1-2 Tage, führen bei Konzentrationen $> 10^{-4} \text{m}$ immer zu toxischen Schäden in der Zellstruktur. Phasenoptisch wird erkannt: Die Zellen sind abgerundet, die Kernstruktur ist undeutlich geworden. Mitochondrien sind stark kugelförmig aufgetrieben. Das Cytoplasma enthält dann meist Fetttropfen großen Durchmessers. Mit diesen phasenoptisch erkennbaren Veränderungen geht nahezu regelmäßig eine intensive Fluoreszenzfärbung des Kerns mit Kernschwellung einher, wobei Fluoreszenz in erheblich geschädigten Zellen nicht nur auf das in der Kernbucht gelegene Golgfeld, wie in gesunden Zellen oft beobachtet, beschränkt bleibt, sondern über das Cytoplasma verteilt bis in die Zellperipherie nachweisbar ist. Nach Verlust ihrer biochemischen Integrität bricht die äußere Membran der Zelle an verschiedenen Stellen auf und Cytoplasmatrümmer sind außerhalb des Zellkörpers als körnige Partikel phasen- wie fluoreszenzoptisch zu finden (Detritus).

Für eine deutliche Differenzierung intrazellulärer Strukturen ohne wesentliche toxische Schädigung geeignet erwiesen sich Fs-Konzentrationen $\leq 10^{-4} \text{m}$ bei Inkubationszeiten von 4h bis maximal 48h. Kurzzeitversuche zur Beobachtung von Minimalveränderungen wie bei Neutralrot (NR) oder Atebrin (121) wurden nicht durchgeführt.

Die Interpretation der beobachteten farbstoffinduzierten morphologischen Veränderungen, welche als im lichtmikroskopischen Sinne neugebildete Zellstrukturen aufzufassen sind, nimmt Bezug auf die schon von D. Wittekind (122) ausgesprochenen Gedanken. Die vorliegenden cytologischen Befunde, welche mit

den 9-Methylacridinderivaten, Verbindungen des Typs 12 (S.15), erhoben wurden, bestätigen die von diesem Autor gemachten Beobachtungen.

2.2.2.1 Befunde mit einzelnen Fluorochromen.

2-Aminoacridin (2-AA)

- a) Bei Inkubation bis 4h Dauer und Fs-Konzentration $10^{-4}m$ bildet sich schwache Grünfluoreszenz im Bereich der Kernbucht (Golgifeld). Der Zellkern bleibt fluoreszenzfrei. Im Vergleich zu den Kontrollzellen ist die phasenoptisch zu beurteilende Größe der Nukleolen unverändert. Es werden weiter phasenoptisch in einigen, nicht allen Zellen um die Kernbucht geordnete Zelleinschlüsse gefunden, die in den Kontrollzellen nicht aufzufinden sind. In Präparaten, die 4h bis 24h angesetzt waren, treten diese Veränderungen so deutlich auf, daß sie in einzelnen Zellen zur auffälligsten Struktur werden, während andere, ebenfalls vitale Zellen völlig frei von diesem Vorgang sind.
- Die Frage von Veränderungen im sublichtmikroskopischen Bereich wurde von uns an dieser Stelle nicht untersucht.

- b) Präparat 24h/Fs-Konzentration $10^{-4}m$ /phasenoptisches Bild:
Der Zellrasen ist dicht gewachsen. Wesentliche morphologische Zeichen (fädige Mitochondrien, weite Zellaufläufer, seltene Einzelzellnekrosen, keine Zeichen für eingeschränkte Mitoseaktivität) deuten auf geringe Toxizität dieser Substanz bei den vorliegenden Bedingungen.

In verschiedenen Zellen werden die genannte, saumartig um das Golgifeld gruppierten, bläschenartigen Veränderungen ziemlich einheitlicher Größe vorgefunden. Das Golgifeld selbst weist im Vergleich zu den Kontrollen nur geringfügige Veränderungen auf: Kleinste, optisch leere Bläschen, uniform, ca. 1μ und kleiner, die eine Tendenz aufweisen, nach zellperipher zu wandern. Vereinzelte Heterolysosomen, am Rande des Golgifeldes liegend, enthalten Reste phagocytierten Materials. Sie werden in dem Phasenkontrastbild als ziemlich stark lichtbrechend erkannt. Die Zellen weisen gegenüber den Kontrollen keine weiteren Besonderheiten auf.

c) Fluoreszenzbild (siehe auch Tab.25):

Im Bereich der Kernbucht tritt gelblichgrüne Fluoreszenz auf, welche die kleinen,phasenoptisch leeren Bläschen ausspart. Umschriebene Fluoreszenz in anderen Zellkompartimenten ist nicht zu beobachten.

2.2.2.2. 2,7-Diaminoacridin (2,7-DiAA,Tab.25)

a) Phasenkontrastbild 24h/Fs-Konzentration $10^{-4}m$:

Die Vitalfärbung mit 2,7-DiAA führt bei diesen Bedingungen zu keinen erkennbaren Veränderungen verglichen mit den Kontrollzellen. Der Zellrasen ist dicht gewachsen, es werden nahezu nur vitale Zellen beobachtet, kaum Einzelzellnekrosen.

b) Fluoreszenzbild: Streng auf die Kernbucht begrenzt ist eine grüngelbe Fluoreszenz sehr geringer Intensität zu beobachten. Im Bereich einzelner phagocytierte Zellreste tritt eine orangerote Fluoreszenz ebenfalls sehr geringer Intensität auf. Fluoreszenz in anderen Zellarealen kommt nicht vor. Bemerkenswert bei diesem Präparat ist:

Im Extrazellulärraum sind Kristalle der im Incubationsmedium bei pH 7,2 wenig löslichen, bei einem $1.pK_s$ -Werte von 5,9 mit 94,5% an der Fs-gesamtkonzentration beteiligten Fs-Base ausgefallen. Um diese Kristalle hat sich in der (lokal) gesättigten Lösung ein Konzentrationsgradient mit der Folge ausgebildet, daß die Zellen in unmittelbarer Nähe zu dieser Zone hoher Fs-Konzentration in ihren Kernbuchten etwas intensiver fluoro-chromiert sind als weiter entfernt liegende Zellen. Nach den vorliegenden Beobachtungen ruft 2,7-DiAA jedoch unter den hier untersuchten Aminoacridinen die geringsten Effekte an vitalfluorochromierten Zellen hervor.

2.2.2.3. 2-Amino-7,9-dimethylacridin (2-AA,7,9-DiMeA)

a) Phasenoptisches Bild 24h/ Fs-konzentration $10^{-4}m$:

Der Zellrasen ist dicht gewachsen, jedoch ist der Anteil an nekrotischen Zellen deutlich höher als bei den Kontrollzellen. Er ist auch im Vergleich zu den Befunden mit den Fs 2-AA und 2,7-DiAA merklich erhöht.

Legende zu Tabelle 25

Phasenkontrastbild Ph

- a) Struktur hat sich Vergleich zu den Kontrollkulturen
neugebildet Ph + oder Ph ++ usw.
- b) Struktur hat sich im Vergleich zu den Kontrollen
nicht neu gebildet Ph -
- c) qualitatives Ausmaß der Neubildung
+++ viele ++ einige + selten (+) fraglich - nicht

Fluoreszenzbild F

- a) Fluoreszenzfarben

grün	gr	hell	h
gelb	ge	dunkel	d
orange	or		
rot	r		
blau	bl		
weiß	w		
- b) Farbmischungen

gelbgrün	gegr	usw.
----------	------	------
- c) qualitatives Maß für Fluoreszenzintensität

+++ sehr intensiv	++ deutlich	+ ausreichend
(+) schwach	((+)) fraglich	- nicht

1 = 2-AA	2 = 2,7-DiAA	3 = 2-A-7,9-DiMeA
4 = 2-A-7-Met-9-MeA		5 = 2,7-DiA-9-MeA

Tabelle 2: Vitalfluoreszenzmierung von Fibroblasten

Fibro- blasten	Zellkern		Kernbucht -Golgifeld-	Hetero- Auto- lysosomen	
	Chromatin	Nukleolus			
	F -	F -	F grge(+)	Ph +	Ph ((+))
				F gr,or(+)	F -
2	F -	F -	F gegr(+)	Ph(+)	Ph -
				F orr(+)	F -
3	F orr ++	F orr ++	F gr ++	Ph +	Ph ++
				F gr ++	F -
				r (+)	
4	F orr +++	F orr ++	F orr +++	Ph ++	Ph ++
				F gr ++	F -
5	F orr +++	F orr +++	F orr +	Ph +++	Ph +++
				F orr +	F -
				orr ++	

Tabelle 25: Fortsetzung

Fluoro- cyanid	Zellausläufer -peripherie	Chromosomen in Mitosen	Einzelzell- necrosen	Zellfragmente -detritus
1	F -	F ge(+) Ph (+)	Ph (+)	F ge (+)
2	F -	Ph + F or(+)	Ph (+)	F gegn(+) orr (+)
3	F -	Ph ++ F orr ++	Ph ++	Ph ++ F gr + orr(+)
4	F -	Ph +++ F ror ++	Ph (+)	Ph + F gr(+) orr(+)
5	F -	Ph + F r ++	Ph (+)	Ph (+) F gegr + orr ++

Zahlreiche Heterolysosomen, die das Golgifeld als Saum eingrenzen, treten in das Blickfeld. Ihre Größe ist um 3μ . Daneben lassen sich gleichfalls das Golgifeld aussparend im gesamten perinukleären Raum kleine, dichte, farbstoff-induzierte Zellveränderungen, Autolysosomen, (nach 121) nachweisen. Das Gebiet beider Lysosomenarten wird zusätzlich von kleinen, optisch leeren Bläschen (Lipidtröpfchen und Vorstufen der Heterolysosomen) durchsetzt. Die Zellperipherie ist frei von diesen Veränderungen. Die Pseudopodien in vitalen Zellen sind weit ausgestreckt, die Mitochondrien langfädig. Dies spricht bei integren Zellen für einen ausgeglichenen ATP-Stoffwechsel (4). Die Kernstrukturen lassen sich phasenoptisch gut differenzieren: Die mittlere Größe der Nukleolen muß im Vergleich zu der der Kontrollzellen als reduziert beurteilt werden, (Tab. 25). Entsprechend beobachtet man im

b) Fluoreszenzbild:

Im Golgifeld ist eine deutliche, grüne Fluoreszenz lokalisiert. Die verschiedenen Lysosomenarten lassen sich fluoreszenz-optisch unterscheiden. Heterolysosomen fluoreszieren je nach Inhalt grün oder rotorange. Autolysosomen fluoreszieren nicht. Die Heterolysosomen enthalten zum einen Stoffe, die dem Fs-Kation Anlaß zur Fluoreszenz bieten. Dann enthalten sie Material, welches bei 37°C in einem Milieu des $\text{pH} < 6$, $< 1. \text{pK}_s$ dieser Substanz bei 37°C , in diesen Organellen metabolisiert wird. Zum anderen setzen diese Organellen Stoffe bei einem $\text{pH} > 6$ um und bieten der Fs-Base somit die Möglichkeit zur Fluoreszenz. Zum dritten können sie phagocytisierte Kernbestandteile (Nukleinsäuren) enthalten, welche nach den Ausführungen des physikalisch-chemischen Teiles der Arbeit, S. 63f., in einer auswählenden Reaktion ph-unabhängig Kationen binden, die somit fluoreszenzmikroskopisch erkennbar sind. Die kleinen, phasenoptisch leeren Vesicel fluoreszieren in der Farbe der Fluorochrombase deutlich gelbgrün und sind gegenüber dem ebenfalls gelbgrün fluoreszierenden Golgifeld abgrenzbar. Der Zellkern fluoresziert nun intensiv.

Es ist ein Untergrund zu erkennen, der schwach rotorange fluoresziert. Gegen diesen heben sich verdichtete Chromatinareale und die Nukleolen in einer hell orangeroten Fluoreszenz ab. Die Fluoreszenzintensität der Nukleolen ist jedoch etwas geringer als die der Chromatinareale.

Man kann gut beurteilen, daß die Größe der Nukleolen, ihre fluoreszierenden Bereiche, geringer ausgedehnt ist als in den ungefärbten Kontrollzellen oder den Zellen, die mit 2-AA oder 2,7-DiAA incubiert worden sind. Die Chromosomen von Zellen in Mitosen sind deutlich orangerot fluorochromiert. In Anaphasen lassen sich auch gelbgrün fluoreszierende Teilungsspindeln gegenüber dem Zellplasma abgrenzen.

2.2.2.4. 2-Amino-7-methoxy-9-methylacridin (2-A-7-Met-9-MeA)

a) Phasenkontrastbild 24h/Fs-Konzentration 10^{-4} M/:

Der Zellrasen ist gut gewachsen, es sind wenige Zellen nekrotisch. Diese Substanz ist offensichtlich nicht so toxisch wie die davor besprochene, jedoch intensiver cytochemisch aktiv als 2-AA und 2,7-DiAA.

Im Vergleich zum vorhergehenden Befund mit 2-A-7,9-DiMeA haben die Zellen noch mehr Autolysosomen gebildet. Hingegen ist die Zahl der Heterolysosomen etwas geringer, sie sind aber im Schnitt als größer zu beurteilen. In der Kernbucht sieht man keine dieser Veränderungen. Zwischen diese Lysosomen sind auch bei diesem Präparat kleine und kleinste Vesicel eingestreut, die phasenoptisch leer erscheinen. Viele vitale Zellen zeigen weitausgestreckte Zellausläufer, ihre Mitochondrien sind zart fadenförmig strukturiert, ein Tatbestand der die Zellvitalität vor allem anzeigt. Es lassen sich auffallend viele Prophasen diagnostizieren.

b) Fluoreszenzbild:

Das Cytoplasma ist im Bereich des Golgifeldes äußerst intensiv gelbgrün in der Farbe der Fs-Base fluorochromiert worden. Ein Teil der kleinen, phasenoptisch leeren Vesicel fluoresziert ebenfalls in dieser Farbe. Alle großen, multiformen Heterolysosomen zeigen Fluoreszenz: meist

gelbgrün, seltener rotorange. Der Abbruch der Fluoreszenzintensität zur Zellperipherie ist scharf, die Peripherie ist fluoreszenzfrei. Die Mitochondrien fluoreszieren nicht.

Kernchromatin und Nukleolen leuchten intensiv orangerot, letztere mögen vielleicht eine geringe Stufe schwächer fluoreszieren.

Die Chromosomen in Mitosen sind intensiv orangerot gefärbt. In den im Präparat zahlreich vorhandenen Prophasenzellen tritt das Kernprotein als feine grüne Fluoreszenz um die Chromosomen in Erscheinung. In seltenen Anaphasen können grünlich fluoreszierende Teilungsspindeln differenziert werden.

Insgesamt ist das Präparat 2-A-7-Met-9-MeA dem 2-A-7,9-DiMeA bezüglich der Intensität der Fluorochromierung von vitalen Zellstrukturen deutlich überlegen.

2.2.2.5 2,7-Diamino-9-methylacridin (2,7-Di-9-MeA, Tab.25)

a) Phasenkontrastbild 24h/ Fs-Konzentration 10^{-4}m :

Bei dichtem Zellrasen - also gutem Wuchs - fällt sofort die Masse der offensichtlich unter Fluorochromeinfluß entstandenen Lysosomen auf: Unter den hier geprüften Verbindungen liegt in dieser der stärkste "Lysosomeninduktor" vor. Man erkennt zahlreiche große, eng zusammenliegende, polymorphe sowie auch kleine, eher homogene, sehr dichte, neugebildete Cytoplasmaeinschlüsse. Der gesamte perinukleare Raum wird, das Golgifeld einsäumend, von diesen morphologischen Veränderungen betroffen.

Die Zellperipherie ist überwiegend frei von diesen Gebilden. Selten können aber sehr große Lysosomen in die Zellperipherie hineinragen. Man gewinnt jedoch einen Eindruck, solche farbstoffinduzierten Gebilde würden eher regelmäßig in Kernnähe lokalisiert. In abgestorbenen Zellen sind die Cytoplasmabestandteile unregelmäßiger verteilt. Eine genaue

Differenzierung der zahlreichen granulären Zelleinschlüsse ist dann nicht mehr möglich. Zusätzlich macht eine starke Kernschwellung in solchen Zellen die Erkennung der Chromatinmuster häufig unmöglich.

In gesunden Zellen können Chromatin und Nukleolen gut beurteilt werden. Die Nukleolen sind stark lichtbrechend und im Vergleich zur Kontrollkultur deutlich kleiner.

Mitosen lassen sich ohne besondere Bevorzugung einer bestimmten Teilungsphase auffinden. Entsprechend sieht man im

b) Fluoreszenzbild:

Chromatin und Nukleolen zeigen eine intensive, rotorange Fluoreszenzfarbe mit einem deutlichen roten Unterton im Bereich der Nukleolen. Unter den hier untersuchten Verbindungen kann mit dieser die intensivste Kernfluoreszenz erreicht werden. Im Bereich des Cytoplasmas hingegen kann nur noch eine mäßige grüngelbliche Fluoreszenz, vorwiegend auf das Golgifeld beschränkt, erkannt werden. Im Vergleich zu den beiden anderen hier diskutierten 9-Methylacridinderivaten ist die Fluoreszenzintensität in diesem Zellareal wesentlich geringer. Unter den so zahlreichen Lysosomenarten kann nur in den großen Heterolysosomen eine unregelmäßig verteilte Fluoreszenz gefunden werden, die sich mit den schon beim 2-A-7,9-DiMeA vorgetragenen Argumenten beschreiben läßt. Wichtig ist dabei, daß auch die durch 2,7-DiA-9-MeA induzierten kleinen Autolysosomen nicht fluoreszieren. Chromosomen in verschiedenen mitotischen Phasen werden intensiv orangerot dargestellt, mitunter ist eine zart grünlich gezeichnete Mitosespindel zu erkennen.

Nebenbeobachtung:

Um einen grob orientierenden Überblick über eventuell vorhandene antibiotische Eigenschaften der untersuchten Acridinderivate zu gewinnen, wurden offene Behälter mit in Nährmedium gelösten Acridinen bei Zimmertemperatur aufgestellt. Es waren nach mehreren Tagen Hefen zu erkennen, die eine lebhafte Sprossung zeigten und im Fluoreszenzbild eine grünbläuliche Fluoreszenz aufwiesen: Die Substanzen sind offensichtlich kaum antibiotisch aktiv.

2.2.2.6 Beobachtungen zur Vitalfluorochromierung mit 2-Amino-9-methylacridin (2-A-9-MeA)

Nach Abschluß der hier vorgetragenen Ergebnisse der Hauptuntersuchung wurde aus der Sammlung von D. Wittekind noch die genannte Verbindung in der Vitalfluorochromierung von Fibroblasten geprüft.

a) Phasenkontrastbild /24h/Fs-Konzentration 10^{-4} m/:

Bei zu den bisher besprochenen Substanzen ähnlichen chemischen Eigenschaften wirkt diese Substanz auf lebende Fibroblasten vergleichsweise am stärksten toxisch. Man sieht viele nekrotische Zellen. Der Zellrasen ist nicht dicht gewachsen. Wenige vitale Zellen weisen Autolysosomen auf. Relativ mehr Zellen enthalten Heterolysosomen; deren Lokalisation ist vorwiegend perinukleär, das Golgifeld einrahmend.

b) Fluoreszenzbild:

Im Golgifeld leuchtet eine gut erkennbare grüne Fluoreszenz. Zellkern und -peripherie fluoreszieren nicht. Nur Heterolysosomen fluoreszieren dazuhin je nach Inhalt gelbgrün oder rotorange.

Diese Verbindung besitzt offensichtlich ebenfalls nicht die Fähigkeit, lebende Zellkerne zu fluorochromieren. Sie teilt diese Eigenschaft mit den Verbindungen 2-AA und 2,7-DiAA.

Es bleibt interessant, festzustellen, daß die beschriebene Fluorochromierung vitaler Zellkerne nur durch diese 2,7- und 9- trisubstituierten Acridinverbindungen erzielt werden kann (Tab. 15).

Die soeben dargestellten Befunde an vitalgefärbten Fibroblasten ließen zwei wesentliche zelluläre Antworten auf die Farbstoffexposition erkennen:

1. Die farbstoffabhängige Fluorochromierung von Kern- und Cytoplasmaarealen und
2. die ebenfalls farbstoffabhängige Variation der Induktion von Autolysosomen. Dieser Prozeß wird auch farbstoffabhängige Variation autophagischer Vakuolenbildung genannt

(91,118), welche, wie schon betont, als eine im lichtmikroskopischen Sinne ablaufende Neubildung einer zellulären Struktur aufgefaßt wird. Es ist daher erwünscht, diese in vivo entstandenen Cytoplasmaveränderungen durch eine geeignete Fixation formgerecht zu erhalten. Eine Beurteilung von somit über die Vitalfärbung hinaus dauerhaft dargestellten Präparaten wäre wesentlich erleichtert.

2.2.2.7 Fixation und Beurteilung vitalfluorochromierter Zellen unter Strukturhaltung und Verlust der Fluoreszenz

Eine Fixation, die eine gesetzmäßige Strukturhaltung vitalfluorochromierter Zellen unter besonderer Erhaltung lysosomaler Zellelemente gestattet, liegt nach D. Wittekind et al. (121) in der Fixation mit Na-Permanganat vor. Bei dieser Fixation verschwindet gleichwohl die gesamte Fluoreszenzintensität, lysosomale Zellelemente indessen werden besonders deutlich erhalten und können in einer phasenoptischen Untersuchung beurteilt werden. Verschiedentlich wird auch die Nachfärbung solcherart fixierter Präparate vorgeschlagen. Dies ist hier zunächst nicht erfolgt. In Tabelle 26 sind die wichtigsten morphologischen Befunde von vitalgefärbten und nach diesem Verfahren fixierten Fibroblasten zusammengestellt.

Aus den in dieser Tabelle aufgeführten Befunden geht hervor, daß die an anderen Vitalfarbstoffen gewonnenen Befunde auch bei diesen Acridinverbindungen im wesentlichen zutreffen: Diese Fixationstechnik gestattet die Erhaltung charakteristischer morphologischer Zellveränderungen bei der Vitalfärbung durch diese Acridinderivate.

Die Lysosomen, welche mit 2,7-DiA-9-MeA induziert worden sind, erscheinen im Phasenkontrastbild besonders stark lichtbrechend. Dazuhin ist zu beobachten, daß in der Fixation bevorzugt MnO_2 von Autolysosomen gebunden wird (Es wurde nach Fixation genügend gespült, jedoch wurde das entstandene MnO_2 nicht mit Ascorbinsäure zu leicht löslichem Mn^{2+} reduziert). Das Ausmaß der Induktion autophagischer Vakuolen gibt in diesen Präparaten die schon vital erkannte Rangfolge wieder: Die stärkste Induktionssubstanz ist 2,7-DiA-9-MeA.

Tabelle 26: Phasenoptische Untersuchung wesentlicher, fixierter morphologischer Veränderungen nach Vitalfluorochromierung von Fibroblasten

Fluorochrom wie Tab.25	Zellkern Chromatin Nukleolus		Heterolysosomen	Autolysosomen
1	dg	3	2 (+)	1,2((+))
2	dg	3	1,2,3(+)	-
3	dg	2	1,2 +	1 ++ 2 (+)
4	dg	1	1,2 ++ 3 +	1 +++ 2 (+)
5	dg	1	1,2,3 +++	1 + 2,3 +++
Kontrollkulturen		3	1,2,3 +	-

Legende zu Tab.26 a) Chromatin differenzierbar gegen die Nukleolen dargestellt, Bezug Kontrollkulturen = dg

b) Rangfolge von Größe und Anzahl der Nukleolen: 3 wie in Kontrollzellen
2 Größe und Anzahl mäßig reduz.
1 " " " deutlich erkennbar reduziert

c) Abfolge der Größe der Lysosomen
3: $\phi > 3\mu$ 2: $\phi \sim 1-3\mu$ 1: $\phi < 1\mu$

Abgeschwächt aktiv in dieser Hinsicht zeigt sich 2-A-7-Met-9-MeA. Diese Verbindung induziert bevorzugt kleine Autolysosomen, während die Anzahl der Heterolysosomen geringer ist. Nahezu gleich zu dieser Verbindung ist 2-A-7,9-DiMeA einzustufen. Es werden vergleichsweise viele Autolysosomen induziert, die Heterolysosomenbildung ist jedoch bereits merklich geringer. Die beiden Verbindungen 2-AA und 2,7-DiAA schließlich zeigen nahezu keine relevanten Befundänderungen im Vergleich zu den Kontrollkulturen. Es muß aber angemerkt werden, daß in mit 2-AA fluorochromierten Zellen auch nach der Fixation nicht regelmäßig Zelleinschlüsse zu beobachten waren, die von uns aber nicht als Autolysosomen klassifiziert werden konnten.

Vergleichbar zu den cytoplasmatischen Veränderungen lassen sich die Auswirkungen auf die Kernstrukturen auch nach der Fixation noch beobachten. Die 9-Methylacridinderivate - Fluorochrome des vitalen Zellkernes - führen zu einer regelmäßig erkennbaren Reduktion von Nukleolengröße und -anzahl.

Ebenso gesetzmäßig werden durch 2-AA und 2,7-DiAA, welche bereits keine Kernfärbungen erzielen konnten, nach Fixation auch keine Kernstrukturveränderungen im genannten Sinne im Vergleich zu den Kontrollkulturen beobachtet. Somit läßt sich aus den Befunden nach Vitalfluorochromierung und anschließender Fixation der Präparate eine vorläufige Regelmäßigkeit erkennen:

- a) Die ablaufende Vitalfärbung von Zellkern- und cytoplasmabestandteilen hat Beziehung zu verstärkter Hetero- und Autolysosomenbildung. Dem Ausmaß dieser Prozesse entsprechend zeigen sich Größenveränderungen an den Nukleolen.
- b) Geringe Cytoplasmafärbung bei fehlender Vitalfluorochromierung des Zellkernes löst im Cytoplasma und im Zellkern auch keine im lichtmikroskopischen Sinne wesentliche Strukturveränderung aus.
- c) Bemerkenswert sind die erheblich differierenden Befunde, die einerseits mit 2,7-DiA-9-MeA und andererseits mit dem physikalisch-chemisch so nahe verwandten 2,7-DiAA erhoben werden müssen.

2.2.3. Fluoreszenzfärbungen an unvorbehandelten in Kultur
gewachsenen, fixierten Helazellen und Mäusefibroblasten
2.2.3.1. Einleitung

Fluoreszenzfärbungen fixierter Zellen geschehen am gleichen Substrat wie bei Vitalfärbungen. Nur ist die Zelle jetzt in einem geänderten physikalisch-chemischen Zustand. So sind z.B. die Makromoleküle DNA und RNA demaskiert, d.h. ihre Bindungen an Proteine sind gelockert oder gelöst. Damit sind aber deren Phosphatgruppen als negative Ladungsträger für Fs-Kationen leichter erreichbar. Phospholipide, Neutralfette sind nach Alkoholfixation weitgehend geschwunden. Kohlenhydrate werden vor allem durch Wassereinwirkung herausgelöst. Die wesentlichen Bestandteile in fixierten Zellen zur Färbung sind Nukleoproteine, Nukleinsäuren und Cytoplasmaproteine. Entscheidend für das erzielte Färberesultat ist somit der pH-Wert des Färbebades: Zum einen im Hinblick auf die IEP-Werte der Proteine -also deren Umladebereich- und zum anderen wegen der besonders interessant liegenden $1.pK_s$ -Werte der hier untersuchten Acridinverbindungen. Auf Grund der Meßergebnisse des chemischen Teiles (S.59 ff.) müssen folgende pH-Bereiche als zur Färbung bedeutsam erscheinen:

Bereich pH 3,3 -3,8	überwiegend Monokationen der Fs
Bereich pH 5,6 -6,7	wechselndes Anteile Monokationen und Fs-Base
Bereich pH > 8	Fs-Base überwiegend

Die Ergebnisse sind in Tabelle 27 aufgeführt. Die Pufferlösung zur Färbung war Veronal-acetat-HCl nach Michaelis(132), 0,05 m.

Legende zu Tabelle 27:

Die Angabe der Fluoreszenzfarben erfolgt wie in Tab.25. Hela Helazellen, IM Mäusefibroblasten, item derselbe Befund, wie in der Spalte oder Zeile, von welcher der Pfeil $\rightarrow$ herzeigt. Entsprechendes Phasenkontrastbild Ph, Aufquellung und Verlust der Struktur differenzierung Aq.VSD. Angabe der Färbedauern in min 15' / 15'-30' usw.

Tabelle 27: Fluoreszenzfärbung fixierter, unvorbehandelter
Hela-zellen und Mäusefibroblasten

2-AA		pH 3,65/30'	pH 6,55/15'-30'	
Kern				
Chromatin	LM, Hela	F orge +	LM, Hela } F or(+)/30'	
Nukleolus	LM, Hela	F dorr +		
Chromosomen in Mitosen	LM, Hela	F ngeor ++	LM	F ge + /30'
			Hela	F geor +/15'
Cytoplasma				
Kernbucht	LM, Hela	F gegr(+)	LM, Hela	F gr(+)
Zellausläufer	LM, Hela	F -	LM, Hela	F gegr((+))
2,7-DiAA		pH 2,55/ 15'-30'	pH 6,75/15'	pH 8,45/15'-30'
Kern				
Chromatin	LM, Hela	F dorr ++	→ item	LM, Hela } F A . 11 F gegr(+)
Nukleolus	LM, Hela	F dorr +	→ item	
Chromosomen in Mitosen	LM, Hela	F dorr ++	→ item	item
Kernbucht	LM	F gegr (+)	LM, Hela	F gr(+)
	Hela	F gr +		LM, Hela
Zellausläufer	LM, Hela	F gegr((+))	LM, Hela	F gr((+))

Tabelle 27: Fortsetzung

2-A-7,9-DiMeA	pH 3,55/ 15'	pH 6,55/ 30'	pH 8,45/ 15'-30'
Kern			
Chromatin	LM, Hela F horrr++	→ item	LM, Hela } Ph Aq
Nukleolen	LM F dr +	→ item	LM, Hela } F orr
	Hela F horrr++	→ item	
Chromosomen in Mitosen	LM, Hela F horrr++	→ item	LM, Hela F geor
Kernbucht	LM F dgr +	LM, Hela F gr++	LM, Hela } Ph Aq
	Hela F hgegr +		} F gr(+)
Zellausläufer	LM, Hela F or((+))	LM, Hela F gr +	LM, Hela F gegr
2-A-7-Met-9-MeA	pH 3,55/ 15'	pH 6,45/15'-30'	pH 8,45/15'
Kern			
Chromatin	LM, Hela F horrr+++	→ item	LM, Hela } Ph Aq, v
Nukleolen	LM, Hela F drorr++	→ item	} F hor
Chromosomen in Mitose Teilungsspindel	LM, Hela F hrorr+++	→ item	LM, Hela F or +
		LM, Hela F grse(+)	
Kernbucht	LM, Hela F hgegr+	LM, Hela F gr ++	LM, Hela F gr +
Zellausläufer	LM, Hela F hor((+))	LM, Hela F gr(+)	LM, Hela F gegr
2,7-DiA-9-MeA	pH 3,55/15'	pH 6,75/15'	pH 8,45/15'
Kern			
Chromatin	LM, Hela F horrr+++	→ item	LM, Hela } Ph Aq, v
Nukleolen	LM, Hela F drorr++	→ item	} F r ++
Chromosomen in Mitosen	LM, Hela F hrorr+++	→ item	↓ item
Teilungsspindeln		LM, Hela F gegr(+)	
Kernbucht	LM F geor(+)	LM, Hela F gegr +	LM, Hela F gegr
	Hela F gegr +		
Zellausläufer	LM } F orr(+)	LM, Hela F gr(+)	LM, Hela F gr(+)

2.2.3.2 Diskussion der Ergebnisse (Tabelle 27)

Wie aus dieser Tabelle hervorgeht, erzielt man mit allen in dieser Arbeit untersuchten Acridinverbindungen eine Fluoreszenzfärbung fixierter intrazellulärer Substrate. Im Cytoplasma läßt sich mit diesen Fluorochromen pH-abhängig eine rotorange, orange, gelbgrüne oder grüne Fluoreszenz beobachten. Diese wird einerseits von Monokationen und andererseits von den Farbstoffbasen ausgelöst. Bevorzugt wird das Golgifeld fluorochromiert.

Zur Zellperipherie hin nimmt die Fluoreszenzintensität rasch ab, oft fehlt jede Fluoreszenz. Vereinzelt aufzufindende Reste phagocytierte Zellbestandteile fluoreszieren je nach Ausmaß des lysosomalen Abbaues gelbgrün oder rotorange. Werden im Phasenkontrastbild Bereiche der Anhäufung von Mitochondrien erkannt, findet man im zugehörigen Fluoreszenzbild eine Aussparung.

Besonderes Interesse genießen wiederum die Kernfärbungen. Da in den Zellkernen die - wenn auch durch Fixation demaskierten - Nukleinsäuren die Substrate zur Fluorochromierung darstellen, dürfen Färbeergebnisse beobachtet werden, die zu den spektrophotometrischen Messungen (S.65 ff.) und den Befunden der Vitalfluorochromierung analog sind: Tatsächlich führen die Kernfärbungen im Gegensatz zu den Cytoplasmafärbungen wiederum zu Unterschieden bei den Resultaten, die man einerseits mit 2-AA und 2,7-DiAA und andererseits mit der Gruppe der 9-Methylacridinverbindungen 2-A-7,9-DiMeA, 2-A-7-Met-9-MeA und 2,7-DiA-9-MeA beobachtet.

a) Die Verbindungen 2-AA und 2,7-DiAA färben den Zellkern pH-abhängig in der Farbe des Kations (pH 3,65) oder der Farbe der Base (pH 8,45) im Sinne einer orthochromatischen Färbung.

Bei pH 6,5 - 6,7 wird noch eine ausreichende Konzentration an Monokationen angeboten, welche nach 30' den Kern rotorange oder zumindest orangegelb (Mischfarbe von Monokation und Fs-Base) zu färben gestattet. Eine kurzzeitige Fluorochromierung (5') läßt jedoch nur eine geringe grünliche Fluoreszenz entstehen, welche der Fs-Base zugeordnet wird.

Ein weiteres Präparat, bei pH 1,33 gefärbt, unterstreicht die Beobachtung, daß diese beiden Acridinderivate keine besondere Nukleinsäureaffinität im Sinne der "NSR" (S.65) aufweisen: Da bei diesem pH die Nukleinsäuren des Kerns nahezu vollständig reprotoniert sind, bilden sie zu den Fs-Molekülen, die jetzt einen erheblichen Anteil an Dikationen aufweisen, keine salzartige Bindung mehr aus. Vielmehr orientieren sich die Fs-Ionen nun in einer Weise, wie sie von dem Gesamtladungsmuster der Nukleinsäuren und Nukleoproteine ausgelöst wird. Analoges gilt für deutlich alkalische pH-Werte. Die Phosphatgruppen wären noch zu ionischer Bindung befähigt, jedoch die Färbelösung enthält jetzt nur ausschließlich Moleküle der Fs-Base, welche nicht zur "NSR" befähigt in einer Weise orientiert sind, wie es das Gesamtladungsmuster bei diesem pH vorgibt.

b) Entschieden im Gegensatz zu diesen Befunden stehen die Resultate der Kernfärbungen mit den 9-Methylacridinderivaten. Auch an fixierten Zellen kann der Ablauf der sog. NSR dieser Verbindungen verfolgt werden. Obwohl z.B. bei einem pH von 8,5 bei 2,7-Di-9-MeA nur noch weniger als 0,9% Monokationen an der Gesamtkonzentration des Fs beteiligt sind, läuft die "NSR" ab: Es werden die bei der Färbung bei dem gegebenen pH in einer bestimmten, wenn auch geringen Konzentration vorliegenden Monokationen in der NSR in spezieller Weise gebunden. Sie werden durch die Nukleinsäuren ausgewählt verbraucht und aus dem Anteil der Fs-Base laufend gemäß Gl.1 (S.7) nachgeliefert. Die Belegung der besonderen Bindungsplätze in den Nukleinsäuren läuft umso vollständiger ab, je länger die Färbdauer gewählt wird. Die Fluoreszenz gewinnt dadurch an Intensität. Die bei alkalischen pH-Werten erkennbare Quellung der Zellstrukturen schwindet in sauren pH-Bereichen zunehmend. Die Differenzierung gefärbter Zellstrukturen wird dabei zunehmend besser.

Es ließ sich außerdem beobachten, daß die DNA in Fibroblastenkernen gegenüber der RNA der Nukleolen meist eine erhöhte Fluoreszenzintensität aufwies.

Bei den Helazellen waren diese Intensitäten umgekehrt anzutreffen. Dies könnte damit erklärt werden, daß die Nukleolen in Helazellen im Schnitt größere Durchmesser aufwiesen als die in Fibroblastenkernen. Sie enthalten dann mehr RNA, die entsprechend mehr Fs binden kann.

Bei Überfärbungen sind in allen Präparaten auch dunkle bis nahezu schwarze Farbtöne im Bereich von Kernstrukturen erkennbar. Diese sind Hinweis für Schwächung der Fluoreszenzintensität oder Löschung der Fluoreszenz durch Konzentrationslöschung.

Gemeinsam ist somit den Resultaten der Vitalfluorochromierung und Fluorochromierung fixierter Zellen: Die Sonderstellung der hier untersuchten trisubstituierten Acridinverbindungen bei Kernfärbungen ist offensichtlich. Die schon genannte Vorstellung, eine besondere Affinität dieser Verbindungen zu den Nukleinsäuren zunächst vorsichtig mit einem auswählenden Reaktionsmechanismus zu interpretieren, - "NSR" - erfährt durch die vorliegenden Befunde eine weitere Stützung.

2.3. Fluoreszenzfärbungen an ausgewählten Organpräparaten

2.3.1 Einleitung

Eine Studie mit experimentellem Inhalt wie die vorliegende kann naturgemäß keine vollständige Beschreibung von fluoro-chromierten histologischen Präparaten einschließen. Die Auswahl der Organe, die es zu besprechen gilt, muß daher willkürlich bleiben. Die im folgenden geschilderten Befunde stellen eine Auswahl dar, wobei insbesondere solche Organe gewählt wurden, die wegen ihrer charakteristischen Struktur auch in früheren Untersuchungen vergleichbaren Inhaltes Verwendung gefunden hatten, wie Kleinhirn, Leber und Trachea. Die Präparate wurden bei denselben pH-Werten fluorochromiert, wie dies bei den fixierten Hela- und LM-Zellen erfolgt war. Im folgenden werden die Präparate besprochen, in welchen die Befunde besonders charakteristisch sind.

2.3.2 Befunde mit einzelnen Farbstoffen, 2,7-Diaminoacridin

Kleinhirnpräparat, Fixation nach Carnoy, pH 5,65/Färbedauer 15', Fluoreszenzbild, Übersichtsvergrößerung (80fach):

Die Kerne der Zellen im Stratum granulosum der Rinde fluoreszieren intensiv rotorange. Die Zellen liegen sehr dicht beieinander, sodaß sie als einheitlicher orangeroter Fleck zu leuchten scheinen. Die Fasern in dieser Schicht leuchten hell gelbgrün. Die Purkinje-Zellen im Stratum gangliosum weisen gelbliche Zellkörper und dunkelorange Kerne auf. Die im Stratum molekulare anzutreffenden kleinen Rindenzellen sind ebenfalls an rotorange fluoreszierenden Kernen zu erkennen. Sie heben sich deutlich gegen das dichte, grün fluoreszierende Fasergeflecht ab. Man gewinnt den Eindruck, daß die marklosen Rindenfasern heller fluoreszieren als die markscheidenhaltigen Fasern des Kleinhirnmarkes. Diese fluoreszieren vergleichsweise dunkler grün mit einem gelben Unterton. Bei stärkerer Vergrößerung (312,5fach) sind alle Zelltypen besser differenzierbar. Die Kernfarben wechseln von dunkelorangerot (Purkinje-Zellen) zu orangerot (Körnerzellen, Gliazellen).

Alle Fasern sind intensiv fluorochromiert: die der Rindenschicht hellgrün, die der Marksicht dunkelgrün.

Der schmale Cytoplasmasaum der Körnerzellen ist grün mit einem bläulichen Unterton fluorochromiert worden.

Von Interesse ist noch die jetzt deutlicher erkennbare Struktur der Purkinje-Zellen. Das Kernkörperchen ist im Farbton etwas dunkler dargestellt als das übrige, im Phasenkontrast zugeordnete Heterochromatin. Die Fluoreszenzfarbe beider Kernstrukturen ist rotorange.

Offensichtlich tritt bereits soviel Fs in das RNA-haltige Kernkörperchen, daß ein merklicher Anteil der Fluoreszenz durch Konzentrationslöschung wieder verschwindet. Die Nissl-Schollen heben sich im Cytoplasma fleckig-streifig ab. Sie zeigen einen betont gelborangen Fluoreszenzfarbeindruck, wohingegen das übrige Cytoplasma eher gelb erscheint.

2.3.3. 2-Amino-7,9-dimethylacridin

Trachea pH 5,65/15', Essigsäure-Alkoholfixation (siehe prakt. Teil), Übersicht. Es werden besonders Befunde an Knorpelgewebe und Schleimhaut besprochen.

Die Knorpelzellen fluoreszieren dunkelrot, das Territorium leuchtet hell gelbgrün. Die interterritoriale Substanz, welche reich an Chondroitinschwefelsäure ist, fluoresziert intensiv dunkelrot mit einem braunschwarzen Unterton.

Dieser lässt auf Konzentrationslöschung der Fluoreszenz an diesem Chromotrop schließen.

Die Mucosazellen weisen hell rotorange Zellkerne auf, ihr Cytoplasma ist gelbgrün. Im Bereich der Basalmembran ist intensive, hellgrüne Fluoreszenz nachweisbar. In kleinen Gefäßen lassen sich Blutzellen erkennen: Erythrozyten sind grün, Leukozytenkerne orangerot fluorochromiert.

Bindegewebskerne (Fibrocyten) sowie die Kerne von glatter und mitangeschnittener quergestreifter Muskulatur sind ebenfalls an orangeroter Fluoreszenz zu erkennen. Deren Zellkörper weisen hell gelbgrüne Fluoreszenz auf, die noch einen bläulichen Unterton mit sich führt.

Kollagene Fasern fluoreszieren hell gelbgrün.

Bei starker Vergrößerung (312,5-fach) lassen sich in allen Zellkernen Chromatin und Nukleolus mit den Farben orange bis rot unterscheiden.

Die Fluoreszenz der in Mucosazellen basal orientierten Zellkerne ist besonders intensiv rotorange. Das apikale Cytoplasma fluoresziert grüngelb und lässt eine streifige Verteilung der Intensität erkennen. Das Cytoplasma der Schleimzellen ist etwas weiter ausgebreitet als das der Flimmerzellen.

2.3.4. 2-Amino-7-methoxy-9-methylacridin

Trachea pH 5,85/15', Fixation Essigsäure-Alkohol,

Übersicht: Der Befund am Trachealknorpel entspricht dem mit 2-A-7,9-DiMeA erhobenen. Lymphatische Zellen in einem mitangeschnittenen Lymphknoten des paratrachealen Raumes imponieren in ihrer Gesamtheit als orangeroter Knoten, der von einer gelblich-grünen Bindegewebskapsel umfasst wird. In derselben Farbe fluoreszieren einzelne Lymphocyten, die alle drei Wandschichten eines elastischen Gefäßes durchsetzen und sich auch im submucösen Bindegewebe der Trachea aufhalten. Die elastischen Fasern der Tunica media einer Arterie vom elastischen Typ sind als intensiv hellgrün fluoreszierende Bänder zu erkennen. Ein schmaler, heller, grüner Streifen im Bereich der Basalmembran lässt auch dort deutliche Fluoreszenz erkennen.

Starke Vergrößerung: Die Kerne der verschiedenen Zelltypen sind deutlich dargestellt. Heterochromatin und Nukleolus sowie die Chromosomen einzelner mitoseaktiver Zellen sind sicher zu diagnostizieren. Die Fluoreszenzintensität ist höher als bei dem zuvor besprochenen Präparat mit 2-A-7,9-DiMeA. Wie schon erwähnt, entspricht der Befund am Trachealknorpel dem mit diesem Präparat erhobenen. Jedoch ist die Intensität der Farben an diesem Chromotrop wesentlich vertieft. Die interterritoriale Substanz ist so stark gefärbt, daß eine dunkelbraune bis schwarze Farbnuance auftritt.

Im entsprechenden Phasenkontrastbild wird in diesen Zonen eine starke Lichtbrechung beobachtet, welche hier der Hinweis ist, daß die Fluoreszenzintensität dieses Farbstoffes durch Konzentrationslöschung auch an diesem Chromotrop abgeschwächt werden kann.

Die weißen Blutzellen, segmentkernige Granulozyten und Lymphozyten, sind gut differenziert. Die Kernfluoreszenz setzt sich deutlich ab. Das Cytoplasma dieser Zellen fluoresziert gelblich bis gelbgrün. Die Intensität ist, soweit man dies bei der vorliegenden Vergrößerung erkennen kann, perinukleär orientiert. Allerdings ist der Cytoplasmasaum der Lymphozyten sehr schmal.

2.3.5. 2,7-Diamino-9-methylacridin

Leber pH 6,05/ 15'/ Fixation nach Carnoy,
Übersichtsvergrößerung: Die Hepatozytenkerne eines Läppchens fluoreszieren intensiv orangerot, deren Cytoplasma leuchtet grün. Intrasinusoidal gelegene Blutzellen zeigen denselben fluoreszenzoptischen Befund, wie er an den Blutzellen im vorhergehenden Trachealpräparat erhoben werden konnte. Die verschiedenen Zelltypen der Glissontrias zeigen regelmäßig orangerote Zellkerne. Soweit bei der vorliegenden Vergrößerung Cytoplasmaanteile differenziert werden können, fluoreszieren diese gelbgrün.

Starke Vergrößerung: Heterochromatin und Nukleolen in Kernen sind wiederum deutlich unterscheidbar. Sie lassen sich dem Phasenkontrastbefund mühelos zuordnen. Chromosomen in Mitosen sind an ihrer intensiven rotorangen Fluoreszenz auffindbar. Gallengangsepithelien zeigen regelmäßig eine rotorange Kernfluoreszenz. Intraduktales Material ist dunkelgrün dargestellt.

Die mit der Verbindung 2,7-DiA-9-MeA erzielten fluoreszenzoptischen histologischen Befunde zeichnen sich vor allen anderen hier vorgetragenen Befunden aus: Sie zeigen die intensivste Fluoreszenz, wobei die Darstellung intrazellulärer Strukturen besonders deutlich ist.

2.4. Diskussion aller Resultate nach Vitalfluorochromierung und Fluorochromierung fixierter Zellen und Gewebe

Zur nachfolgenden Diskussion muß auf die Meßergebnisse des physikalisch-chemischen Teiles zurückgegriffen werden: Nach diesen bot sich an, die untersuchten Verbindungen auf Grund ihrer spektroskopisch geprüften Eigenschaften in zwei Gruppen einzuteilen:

Die Gruppe der Monoaminoacridinderivate 2-AA, 2-A-7,9-DiMeA und 2-A-7-Met-9-MeA und die Gruppe der Diaminoacridinderivate 2,7-DiAA und 2,7-DiA-9-MeA.

Bei der Messung von Lösungsspektren in Gegenwart der Chromotrope DNA und RNA hat sich jedoch gezeigt, daß die trisubstituierten Verbindungen 2-A-7,9-DiMeA, 2-A-7-Met-9-MeA und 2,7-DiA-9-MeA von den Verbindungen 2-AA und 2,7-DiAA zu unterscheiden sind. Die 9-Methylacridine zeigen eine photometrisch messbare, spezifische Affinität (NSR) zu diesen Chromotropen, während die zuletzt genannten Verbindungen diese nicht zeigen. Ohne den Ablauf dieser NSR schon abschließend deuten zu können, läßt er sich doch in allen hier vorgetragenen cytologischen und histologischen Untersuchungen gesetzmäßig beobachten.

a) Vitale Zellkerne werden ausschließlich durch die 9-Methylacridine in der Farbe der Monokationen fluorochromiert. Gleichzeitig treten charakteristische morphologische Veränderungen in Zellkern und Cytoplasma ein, die phasenwie fluoreszenzoptisch nachweisbar sind.

b) Die Nukleinsäuren in fixierten Zellen und Geweben werden ebenfalls durch diese Verbindungen in der Farbe der Monokationen (pH-unabhängig) fluorochromiert.

c) Bei der Fluoreszenzfärbung mit 2-AA und 2,7-DiAA tritt die NSR nicht auf. Regelmäßig werden daher die Chromotrope des Zellkernes nur in fixierten Zellen und Gewebe pH-abhängig im Sinne einer orthochromatischen Färbung markiert.

d) Am Beispiel von Gewebe wie Trachealknorpel läßt sich zeigen, daß andere nichtnukleäre Chromotrope ebenfalls

erhebliche Mengen dieser Fluoreszenzfarbstoffe binden können. Die interterritoriale Substanz in Trachealknorpelgewebe, die wesentlich aus Mucopolysacchariden aufgebaut ist, wird durch alle hier untersuchten Acridinderivate fluoreszenzoptisch dargestellt.

Die 9-Methylacrdine zeigen an diesen Biopolymeren jedoch keine der "NSR" im Zellkern vergleichbare besondere Färbungsreaktion. Vielmehr fluorochromieren sie ebenso wie 2-AA und 2,7-DiAA diese Substrate pH-abhängig orthochromatisch. Bemerkenswert ist die Tatsache, daß der Baustein Chondroitinsulfat der Mucopolysaccharide sehr intensiv gefärbt wird.

Bei gleicher Färbedauer nehmen die Gewebeareale, die dieses Chromotrop aufweisen, mehr Farbstoff auf als zum Vergleich der Zellkern mit seinen Nukleinsäuren. Der Fluoreszenzfarbe wird dadurch ein dunkler bis schwarzer Farbeffekt beigemischt. Erwartungsgemäß lässt sich in den entsprechenden Phasenkontrastbildern in diesen Arealen eine starke Lichtbrechung finden, welche darauf hinweist, daß die Fluoreszenzabschwächung durch einsetzende Konzentrationslöschung erklärt werden muß.

e) Weitere extranukleäre Areale vitaler wie fixierter Zellen werden durch alle hier genannten Acridine pH-abhängig orthochromatisch fluorochromiert. Insbesondere werden die in den Zellen regelmäßig auffindbaren Areale aus phagocytiertem Material -Heterolysosomen- je nach Inhalt und Fortschritt des lysosomalen Abbaues in der Farbe der Monokationen oder der Fs-Basen fluorochromiert. Die phasenoptisch identifizierten, speziell durch die 9-Methylacridinderivate induzierten Autolysosomen fluoreszieren regelmäßig nicht.

Eine merkliche Affinität zu den Fluoreszenzfarbstoffen besitzt die Kernbucht. In vitalen wird sie regelmäßig in der Farbe der Fluorochrombasen angefärbt, während in fixierten Zellen dieses Zellorganell fluoreszenzoptisch pH-abhängig dargestellt wird.

Die Zellperipherie, die Zellausläufer sind in vitalen Zellen frei von jeder Fluoreszenz, die von diesen Acridinverbindungen ausgelöst werden kann. Die Ausläufer fixierter Zellen werden allenfalls mit einer äußerst geringen Intensität, meist jedoch nicht fluorochemiert. Phasenoptisch erkennbare Mitochondrien sind ebenfalls in vitalen Zellen bei der Fluoreszenz ausgespart. Alle Resultate der cytologischen und histologischen Untersuchungen werden in der Abb. 22 an Hand einer stark schematisierten "Stammzelle" zusammengestellt.

Fortsetzung der Legende zu Abb. 22

B) fixierte Zellen und Gewebe

I - III	Wie bei Vitalen Zellen, zusätzlich pH-abhängige gelbgrüne bis rotorange Fluoreszenz	1,2
IX	Myofibrillen in quergestreiften Muskelzellen	
	pH-abhängige Fluoreszenz grün bis orangerot	1 - 5
X	Basalmembranen und elastische Fasern	
	pH-abhängige Fluoreszenz grün bis orangerot	1 - 5
XI	Knorpelsubstanz in Interterritorien	
	pH-abhängige Fluoreszenz von tiefrot bis dunkelgrün, entsprechende Lichtbrechung phasenoptisch	1 - 5

3. PRAKTISCHER TEIL

3.1. Arbeitsvorschriften zu den spektroskopischen Messungen und den chemischen Synthesen

3.1.1. Messung der Absorption, Fluoreszenz und Polarisation von Absorption und Fluoreszenz

Die Fluoreszenz- und die APF- und FP-Spektren wurden auf einer von D.Bergmann(6) gebauten Apparatur) gemessen. Wie aus der nebenstehenden Skizze ersichtlich ist(Abb.23), wird das von einer Xenonlampe erzeugte Licht durch einen Zeiss-Monochromator spektral zerlegt.Nach einer 50Hz-Modulation wird das Licht durch die Kombination aus einer Konvexlinse und einem Glan-Thomson-Prisma linear polarisiert und in eine Küvette abgebildet.In dieser befindet sich die Probe, eingetaucht in ein geeignetes Dewar-gefäß,auf -195°C abgekühlt. Mit Hilfe eines zweiten Prismas werden die Anteile des parallel und senkrecht zum Erregerlicht polarisierten Fluoreszenzlichtes ermittelt.

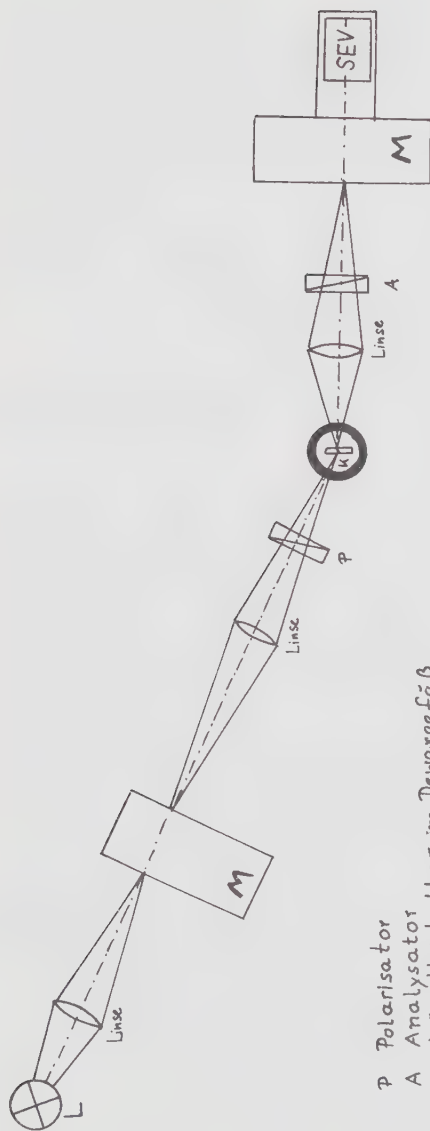
Dieses Licht wird mit einer zweiten Linse auf den Eintrittspalt eines Leitz-Monochromators abgebildet.Die Intensität des Fluoreszenzlichtes wird mit einem RCA-Photo-Multiplier gemessen.Verstärker und Anzeigegerät ist ein Zeiss-PMQ II. Die optischen Achsen der Anregungs- und Emissionseinheit sind um 20° gegeneinander geneigt.

Zu Beginn jeder Messung erfolgt die Korrektur der Apparatur auf Eigenpolarisation und Streulicht.Auf derselben Apparatur werden auch Entfernen der Polarisationsfilterprismen die Fluoreszenzspektren gemessen.Zur Messung kann das Erregerlicht moduliert werden.Die Messung kann dann ohne äußere Raumabdunkelung stattfinden.

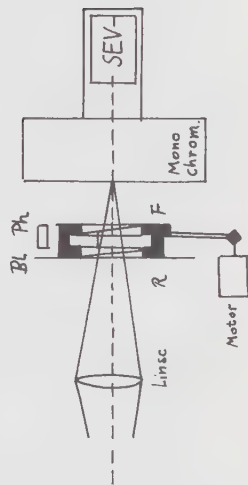
Die Absorptionsspektren wurden auf einem Einstrahlphotometer der Firma Zeiss gemessen.Das Gerät besteht aus einem Monochromator M 4 Q II ,dem Anzeigegerät PMQ II und der Beleuchtungseinheit GMG/30.

Zur Intensitätsmessung wurde ein Photogerät 1P28 benutzt. Die Tieftemperaturmessungen erfolgten in einem selbstgebauten Tieftemperatureinsatz (131).

Abb. 23



- P Polarisator
- A Analysator
- K Küvettenhalter im Dewargefäß
- L Lampe 450 W
- Ph Photowiderstand
- Bl Blende
- R Rotierender Polarisator
- F Feststehender Polarisator



Prinzipieller Aufbau der Apparatur zur

Messung von Polarisationsgradspektren (6)

3.1.2. Bereitung der Lösungen

Die Farbstoff-Basen wurden direkt in die graduierten Maßzylinder eingewogen und in Alkohol (UVasol) Merck) gelöst. Konzentrationen $1-2 \cdot 10^{-4} \text{ m}$. Die alkoholischen Basenlösungen wurden durch Zugabe von ausgewogenem, festem NaOH stabilisiert. Die Lösungen der Monokationen wurden durch Titration mit einer entsprechenden Menge HCl zur Basenlösung erhalten.

Die Normaltemperaturspektren wurden ebenfalls auf einem Einstrahlphotometer der Firma Zeiss gemessen.

Für die Messung von Lösungsspektren wurden die Fs bei verschiedenen pH-Werten in einem Veronal-acetat-HCl-Puffer nach Michaelis(132) . Die Farbstoffbasen wurden in einem Konzentrationsbereich von $5 \cdot 10^{-4} - 5 \cdot 10^{-6} \text{ m}$, die Monokationen in einem Konzentrationsbereich von $5 \cdot 10^{-3} - 5 \cdot 10^{-6} \text{ m}$ untersucht.

Die pK_s -Werte der Verbindungen wurden bei Normaltemperatur bei einer Konzentration 10^{-4} m ermittelt.

Dazu wurde entsprechend der Theorie der Titration schwacher Säuren oder Basen eine absteigende pH-Reihe photometrisch vermessen. Der Wendepunkt der Titrationskurve in den modifizierten Wellenzahl/pH-Diagrammen gibt dann den pK_s -Wert der entsprechenden Protonierungsgleichgewichte wieder.

In der Tabelle 21 sind die isosbestischen Punkte und die nötigen analytischen Wellenlängen angegeben. In der Tabelle 22 sind die ermittelten pK_s -Werte aufgeführt.

Zur Messung spektraler Verschiebungen der Lösungsspektren in Gegenwart von Chromotropen wurden DNA- und RNA-Lösungen hergestellt. Die DNA (Fa. Schuchardt) stammt aus Lachssperma, die RNA (Fa. Serva) stammt aus Hefe. 10^{-4} m und 10^{-5} m Lösungen der Acrdinderivate enthielten 0,1 gr% Nukleinsäure in 0,05 m Veronal-acetat-HCl-Puffer. Bezüglich der primären Phosphatgruppen waren die Nukleinsäuren $\sim 5 \cdot 10^{-3} \text{ m}$.

Die Messungen erfolgten bei pH 7,5 und pH 4,35.

3.2. Arbeitsvorschriften für die chemischen Präparate

Ausgangsverbindungen zu den Synthesen waren 2-Chlorbenzoesäure, F.p. 140°C , unkorrigiert, ebenfalls alle folgenden Festpunkte, (Fa. Schuchardt) und 2-Chloracetophenon, welches in Form eines Destillationsrohproduktes von der Fa. Haarman und Reimers, Holzminden, bezogen wurde. Zur Reinigung wurde es vor den Umsetzungen über eine kleine Vigreux-Kolonne im Wasserstrahlvakuum destilliert.

Physikalische Daten: mmHg 18 738 760
Kochpunkt (K.p.) 113°C 227°C 230°C
 $n_{\text{D}20} = 1,685$

3.2.1. 2-Chlor-5-nitroacetophenon und 2-Chlor-5-nitrobenzoesäure (133)

100 gr HNO_3 (Dichte 1,52) werden auf 0°C abgekühlt. Es wird langsam 10gr frisch destilliertes 2-Chloracetophenon unter dauerndem Rühren eingetropft bzw. 10gr 2-Chlorbenzoesäure wird portionsweise eingetragen. Die Temperatur muß immer unter 5°C bleiben. Nach 3h Nitrierungsdauer im Kältebad wird auf 800gr Eiswasser gegossen. Die Nitroverbindungen präzipitieren in weißen Flocken. Die Produkte werden abgesaugt, mit Wasser gewaschen und mehrfach mit Alkohol umkristallisiert. Sie sind in Wasser unlöslich, in Alkohol oder Benzol gut löslich. Ausbeute nahezu quantitativ.

F.p. 62°C 2-Chlor-5-nitroacetophenon

F.p. 162°C 2-Chlor-5-nitrobenzoesäure

3.2.2. 2-Aminoacridin (Verbindung 7, S.12 für $\text{R}_1 = \text{H}$)

Die Synthese dieser Verbindung erfolgte nach Albert (1).

F.p. 211°C (Base)

Elementaranalyse (Berechnet = Ber., Gefunden = Gef.)

C Ber. 80,50 Gef. 79,44

H Ber. 5,15 Gef. 5,37

3.2.3. 2,7-Diaminoacridin (Verbindung 7, S.12, für $R_1 = \text{NH}_2$)

2-(p-nitrophenylamino)-5-nitrobenzoesäure (12)

Eine Mischung aus 2gr 2-Chlor-5-nitrobenzoesäure und 4gr p-Nitroanilin wird in einem Rückflußkolben aufgeschmolzen. Dann gibt man 5ml Amylalkohol dazu und läßt die Mischung 24h unter mildem Rückfluß unter andauerndem Rühren sieden. Der Alkohol wird nun abgedampft und der zurückbleibende Kuchen abgekühlt. Anschließend wird er pulverisiert und mit HCl extrahiert. Die Säure löst das überschüssige p-Nitroanilin, das nicht umgesetzt worden ist. Der Rückstand erscheint als dunkelbraunes bis grünes Material. Dieses wird mit 15ml heißer Natriumbikarbonatlösung (2 %ig) extrahiert. Beim Abkühlen scheidet sich aus orangeroter Lösung das Kondensationsprodukt aus. Die Kristalle werden zur Reinigung in heißer, konzentrierter HCl gelöst. Nach Zugabe einer gleichen Wassermenge wird heiß filtriert. Im Filtrat scheidet sich die Säure als heller, gelber Körper beim Abkühlen aus. Ausbeute des Vorproduktes 0,5gr = 25 % bezogen auf die eingesetzte Benzoesäure. Die rohe Säure wird in Eisessig unter Zugabe von etwas Aktivkohle umkristallisiert. F.p. $291 - 292^\circ\text{C}$. Die Säure ist in Alkohol gut löslich.

2,7-Dinitroacridanon (43)

Nach Jourdan wird mit Schwefelsäure zyklisiert. 0,5 gr der obigen Säure werden in 0,85 gr H_2SO_4 gelöst und eine Stunde unter gutem Rühren bei (möglichst genau) 88°C belassen. Die dunkelgrüne Lösung wird nun abgekühlt und auf 400 ml Eiswasser geschüttet. Das körnige Präzipitat wird gesammelt und mit 5 ml 2 %iger Natriumbikarbonatlösung in der Wärme geschüttelt. Zurückbleibt ein dunkelgraues Pulver, welches sich in der verdünnten Sodalösung nicht gelöst hat. Es wird in 50 ml heißer, gesättigter NaOH gelöst. Diese Lösung ist dunkelerdbeerrot. Beim Abkühlen fallen die Kristalle des Na-Salzes des Dinitroacridanons aus. Dieses ist auf Grund der zwei Nitrogruppen im Molekül an der Ketonfunktion so acide, daß das Na-ke-tonat faßbar ist. Es wird bereits durch Wasser, rascher durch verdünnte HCl wieder hydrolysiert.

Ein schwach hellgelbgrauer Körper fällt aus.
Ausbeute 250 mgr = 55 % bezogen auf die eingesetzte Diphenyl-
aminsäure. Aus Nitrobenzol wird umkristallisiert. Man
erhält ein Produkt, das jenseits von 370°C unter Zersetzung
sublimiert. Elementaranalyse C Ber. 55,5 Gef. 54,5
 H Ber. 2,45 Gef. 2,68

Reduktion zur Diaminoverbindung

0,5 gr Dinitroacridanon wird in 200 ml heißer NaOH gelöst.
Zur Amalgamreduktion werden 12,5 gr Na (metallisch) ent-
sprechend 250 gr Amalgam (5 %ig) benötigt. Im Rückflußkolben
rührt man kontinuierlich und gibt bei 60 - 70°C portionsweise
das Amalgam zu, Verlauf 2h. Danach hält man noch 1h bei 80°C
unter mildem Rückfluß. Mögliches intermediär gebildetes
Acridan wird durch einen schwachen Luftstrom sofort zum
Acridin reoxidiert. Anschließend kühlt man die Mischung ab,
entfernt das Quecksilber und nimmt die ausgefallenen
gelblichen Kristalle des 2,7-Diaminoacridinrohproduktes auf.
Sie werden aus Nitrobenzol oder viel Wasser umkristallisiert.
Ausbeute 250 mgr, entsprechend 55 %.

F.p. 310 - 312°C

Elementaranalyse C Ber. 74,64 Gef. 74,09
 H Ber. 5,26 Gef. 5,56

Das Monohydrochlorid erhält man durch Lösen der Base in
einer gerade ausreichenden Menge verdünnter HCl. Man fällt
mit der gleichen Menge Alkohol aus, wobei man zweckmäßig
noch etwas einengt. Das Chlorid fällt in dunkelroten Kristallen
aus. Nach längerem Trocknen im Vakuumexsiccator enthält das
Produkt noch wechselnde Mengen Wasser (2-3 mol).

Elementaranalyse C Ber. 66,2 Gef. 62,5
 H Ber. 4,6 Gef. 5,1

3.2.4. Die 9-Methylacridinderivate (Typ 12, S. 15)

3.2.4.1. 2-Amino-7-methoxy-9-methylacridin (Verb. 12, R₂' = OCH₃) 4-Nitro-4'-methoxyphenyl-2-acetyl-diphenylamin:

5 gr 5-Nitro-2-chloracetophenon, 5 gr p-Anisidin, 5 gr K₂CO₃
und eine Spatelspitze Kupferpulver werden in 5 ml Tetralin oder
Amylalkohol 2h unter mildem Rückfluß umgesetzt.

Man dampft das Lösungsmittel ab und erhält ein gelbliches Pulver. Dieses wird mit wenig Wasser gewaschen und aus Alkohol mehrfach umkristallisiert, Rohausbeute 2 gr. Das Produkt ist für weitere Umsetzungen genügend rein.

2-Hydroxy-7-nitro-9-methylacridin

0,5 gr des vorhergehenden Diphenylamins werden in 2,5 ml H_2SO_4 , konz., 2h zyklisiert. Nach Abkühlen und Einrühren in 50 ml Eiswasser fällt ein gelbgrüner Niederschlag aus, der dunkle Beimengungen enthält. Das Rohprodukt enthält noch wechselnde Mengen nicht hydrolysierten Methoxyacridins. Durch Erwärmen kann dieses vollständig nachhydrolysiert werden. Die Ausbeute ist nahezu quantitativ. Die Substanz ist in Alkohol oder Benzol löslich.

2-Methoxy-7-nitro-9-methylacridin

Um quantitativ zur korrespondierenden Methoxyverbindung zu remethylieren wird 0,5 gr der rohen Hydroxyverbindung in 50 ml KOH gelöst. Man filtriert von nicht gelösten Rückständen ab. Durch Schütteln der Lösung mit einem Überschuß an Dimethylsulfat wird remethyliert. Dabei fällt die Nitromethoxyverbindung aus, bevor das Stickstoffatom des Ringes quarterniert ist. Die ausgefallene Base wird aufgenommen und aus Alkohol umkristallisiert, Ausbeute nahezu quantitativ.

F.p. 230°C	Elementaranalyse	C Ber.	68,5	Gef.	66,10
		H Ber.	4,55	Gef.	4,75

Reduktion zur Aminoacridinverbindung

Die Reduktion erfolgt über H_2/Pd katalytisch bei normalem Druck. Dazu werden 0,5 gr der Nitroverbindung in 150 ml Methanol gelöst und 2h katalytisch hydriert. Die Ausbeute ist nahezu quantitativ. F.p. der Base 185°C.

Elementaranalyse	C Ber.	75,5	Gef.	76,3
	H Ber.	5,85	Gef.	6,25

Das Umkristallisieren der Base erfolgt über viel Wasser. Das Chlorid erhält man nach Lösen der Base in Chloroform oder Äther und Ausfällen mit wenig HCl. Nach Trocknen im Exsiccator enthält die Substanz noch ca. 2 Mol Wasser.

Elementaranalyse	C Ber.	65,55	Gef.	60,59
	H Ber.	5,21	Gef.	5,41

Die Substanz sublimiert ab ca. 200°C unter Zersetzung.

3.2.4.2. 2-Amino-7,9-dimethylacridin(Verb. 12, R₂' = CH₃)
4-Nitro-4'-methyl-2-acetyldiphenylamin.

Jeweils 5 gr p-Toluidin, K₂CO₃, 2-Chlor-5-nitroacetophenon und eine katalytische Menge Cu-Pulver werden bei 125°C gür gerührt. Man lässt die Umsetzung 2 1/2 h laufen. Dann wird abgekühlt. Man erhält einen braunen Kuchen, welcher mechanisch zerkleinert und dann mehrere Male mit Wasser gewaschen wird. Nach Umkristallisieren aus Alkohol ergibt sich ein Produkt, welches bei 120°C schmilzt. Es ist in organischen Solventien gut löslich. Ausbeute nach Umkristallisieren 3,1 gr = 61% , bezogen auf das Acetophenon.

2-Nitro-7,9-dimethylacridin

Zum Ringschluß löst man 1gr des dargestellten Diphenylamins in einem Gemisch aus 10 ml Eisessig und 1 ml H₂SO₄ konz. Man erwärmt am Rückfluß auf 125°C und rührt intensiv 1 1/2 h. Nach dem Abkühlen gießt man auf einen Überschuß eiskalten Ammoniakwassers. Man erhält ein braunes Präzipitat, welches aus Benzol oder Nitrobenzol umkristallisiert werden muß. Man erhält schließlich eine Substanz ,welche schwer schmilzt und sich oberhalb von 250°C zersetzt. Es ist in starken Säuren und Aceton wenig löslich. Das Produkt fluoresziert schwach bläulichgrün. Ausbeute 850 mgr = 85%.

Reduktion zur Aminoacridinverbindung

500 mgr der beschriebenen Nitroverbindung wird mit 50 mgr H₂/Pd in 50 ml Methanol im Autoklav unter Überschuß geschüttelt und hydriert. Man klärt mit Aktivkohle und gewinnt das Amin durch Abziehen des Lösungsmittels. Die Ausbeute ist nahezu quantitativ. Das Produkt wird aus viel Wasser umkristallisiert. Es ist auch in Alkohol löslich. Die Base stellt ein gelbliches Pulver dar, welches oberhalb 170°C unter Zersetzung zu schmelzen beginnt. Falls kein Autoklav zur Verfügung steht eignet sich auch die Amalgamreduktion , 6 Atomäquivalente Na pro Mol Nitrogruppe. 150 mgr Nitroacridin wird in 100 ml einer Mischung eingerührt, welche aus 50% Alkohol und 50% einer 5 %igen Sodalösung besteht.

Man gibt portionsweise das Amalgam zu. Anschließend rührt man noch 2h bei 80°C. Man erhält ein dunkles bis hellgelblich-braunes Präzipitat. Dieses wird aus viel Wasser umkristallisiert. Man erhält nun ein hellgelbes Pulver. Ausbeute 70 % bezogen auf die Rohbase. F.p. (unter Zersetzung) 170°C.

Elementaranalyse C Ber. 81,1 Gef. 80,68

H Ber. 6,34 Gef. 6,35

Das Monohydrochlorid wird wie schon beim 2-A-7-Met-9-MeA beschrieben dargestellt.

Elementaranalyse C Ber. 69,5 Gef. 68,6

H Ber. 5,45 Gef. 5,85

3.2.4.3. 2,7-Diamino-9-methyl-acridin (Verb. 12, R₂'=NH₂)
2-Nitro-7-amino-9-methylacridin

Analog zu 2-A-7,9-DiMeA werden 5gr 2-Chlor-5-nitroacetophenon, 5gr p-Aminoacetanilid, 5gr K₂CO₃ und eine katalytische Menge Cu umgesetzt, Reaktionszeit 2 1/2 h. Das Produkt, ein Diphenylamin, wird mit Wasser gewaschen und mehrfach aus Alkohol umkristallisiert. F.p. 112°C, Ausbeute 2,8 gr = 60%. Für den Ringschluß zum Acridin werden in einer Mischung aus 1,5 ml Schwefelsäure und 10 ml Eisessig 1 gr des Diphenylamins gelöst; man lässt eine Stunde bei 120°C reagieren. Man kühlt ab und fällen die rohe Nitroacridinbase in einem Überschuß von eiskaltem Ammoniakwasser aus. Anschließend erfolgt Umkristallisation aus Nitrobenzol. Das erhaltene gelblichbraune Produkt zersetzt sich oberhalb 250°C, ohne zu schmelzen. Die Schutzgruppe des Anilides ist quantitativ hydrolysiert worden, so daß jetzt eine Nitroaminoacridinverbindung vorliegt, Ausbeute der Zyklisierung 0,8 gr = 80%.

Reduktion zur Diaminoverbindung

Die Reduktion der Nitroverbindung erfolgt auf dem selben Weg, wie schon bei 2-A-7,9-DiMeA beschrieben. Es sind dieselben Gewichtsverhältnisse der Reaktanten gültig. Das Diaminoacridin wird aus Nitrobenzol oder viel Wasser umkristallisiert. Die Base ist ein hellgelbes Pulver, F.p. 180°C. In der Literatur sind hierbei wechselnde Angaben bis 200°C zu finden (1,99).

Elementaranalyse der Base C Ber. 75,25 Gef. 74,90

H Ber. 5,65 Gef. 6,17

Das Monohydrochlorid wird wie bei 2-A-7,9-DiMeA beschrieben dargestellt. Elementaranalyse C Ber. 65,0 Gef. 63,59

H Ber. 5,05 Gef. 5,65

3.3. Dünnschichtchromatographische Charakterisierung

Die dünnschichtchromatographische Prüfung auf Reinheit der Verbindungen erfolgte auf Kieselgelplatten der Firmen Macherey&Nagel bzw. Woelm.

Laufmittel Buthanol/Äthanol/Eisessig/Wasser = 5:2:2:1
(55,82,103). R_F -Werte bei 20°C

2-AA	0,68
2-A-7,9-DiMeA	0,66
2-A-7-Met-9-MeA	0,67
2,7-DiAA	0,63
2,7-DiA-9-MeA	0,62

3.4. Erläuterungen zum quantenchemischen Rechenprogramm

Die quantenchemischen Rechnungen wurden mit einem Rechenprogramm durchgeführt, das schon an anderer Stelle beschrieben worden ist(112). Es soll an dieser Stelle nur darauf hingewiesen werden, daß über einen Steuerparameter die Anzahl der zur CI-Rechnung aufgebauten Konfigurationen zu Beginn einer jeden Berechnung neu festgelegt werden kann. In den Ausdrucken der Ergebnisse sind neben den Angaben zu Energie und Oszillatorenstärke der Übergänge, berechnet nach Mulliken(61,69), auch die Übergangsmomente angegeben. In den Ergebnistabellen dieser Arbeit sind die Komponenten des Übergangsmomentes M_x und M_y parallel zu den Koordinatenachsen X und Y berechnet und angegeben. Die semiempirischen Parameter β_x , β_y , α_x und $R_{\lambda\mu}$ wurden an Kohlenwasserstoffen und heterozyklischen Basen geprüft und angepasst.

3.5. Biologische Untersuchungen. Material und Methoden

3.5.1. Cytologisches Untersuchungsmaterial

Die Fluorochromierungsversuche wurden an lebenden und fixierten, in "Monolayerkulturen" gezüchteten Fibroblasten und Helazellen durchgeführt. Das Nährmedium war Nr. 119 der Fa. Gibco; ihm wurde Kälberserum der Fa. Flow-Laboratories (Lot 41105 U), 5%ig, zugesetzt.

Die Deckgläschen zur Gewebezucht hatten die Größe 10,5 . 22 mm.

3.5.1.1. Vitalfluorochromierung

Zur Vitalfärbung wurden die Farbstoffe als Chloride, wie bei den chemischen Arbeitsvorschriften angegeben, in entsprechenden Molaritäten ($2 \cdot 10^{-3} \text{ m}$) eingewogen. Dies erfolgte direkt in die Hanks-Stammlösung. Zur Incubation wurden diese Lösungen in das obige Nährmedium steril umgefüllt und auf die tatsächliche Konzentration des Experimentes verdünnt. Die Incubationszeiten betrugen 4h bis 2 Tage.

Die mikroskopische Untersuchung erfolgte nach Beenden der Incubation. Die Präparate wurden mit Nährmedium gespült und eingedeckt dem Fluoreszenzmikroskop zugeführt. Das Ergebnis wurde protokolliert und ggf. photographiert. Der Vergleich erfolgte zu unbehandelten Kontrollkulturen.

3.5.1.2. Fluorochromierung fixierter Zellen

Unbehandelte Monolayerkulturen, wie oben beschrieben, wurden entweder mit Methanol (100%ig) 5' - 15' fixiert oder in Carnoy'scher Lösung 5' - 10' fixiert und anschließend bei verschiedenen pH-Werten fluorochromiert.

3.5.1.3. Fixation vitalfluorochromierter Zellen

Ein Teil der vital gefärbten Zellen wurde in dem Fixationsmittel NaMnO_4 in 2,5% Veronal-acetat-HCl-Puffer bei pH 6,8 fixiert. Der Befundvergleich erfolgte diesmal zu unbehandelten und ebenfalls auf diesem Wege fixierten Kontrollkulturen.

3.5.2. Histologisches Untersuchungsmaterial

Versuchstiere: Es wurden in Handel erworbene ,nicht ausgewählte weiße Ratten verwendet. Die Tiere waren im Durchschnitt 250 gr schwer und erhielten genügend Wasser und Nahrung. Sie wurden nicht weiter vorbehandelt. Den Tieren wurden unmittelbar nach der Tötung Organproben entnommen und entweder in Carnoy'scher Lösung oder in Bouin'scher Lösung fixiert, Fixationszeiten maximal 24h. Die Organe wurden aufgebloeckt und als 6 μ dicke Paraffinschnitte auf Objektträger aufgelegt und fluorchromiert, nähere Angaben dazu bei R. Romeis (132).

Fluorchromierung fixierter Zellen und Organschnitte

Die Fluorchromierungstechnik nach L. Bertalanffy et al. (7) wurde hier modifiziert angewandt. Die Fluoreszenzfärbungen wurden bei verschiedenen pH-Werten in einem Veronal-acetat-HCl-Puffer nach Michaelis (132) 0,05 M durchgeführt. Die Konzentrationen der Fluoreszenzfarbstoffe wurden zwischen $5 \cdot 10^{-3}$ M und 10^{-4} M gewählt. Die Färbedauer betrug 5' bis maximal 24 h. Als Normaldauer konnten 15' festgelegt werden. Da bei pH-Werten im Bereich des 1. pK_s -Wertes dieser Verbindungen und stärker alkalischen Werten die Neigung dieser Verbindungen auszufallen erheblich ist, (AO^+ ist vergleichsweise erheblich besser löslich), müssen die Färbebäder möglichst immer wieder frisch angesetzt werden.

Mikroskopie

Verwendung fand ein Zeiss-Universal-Forschungsmikroskop für Durchlicht(Hellfeld)-, Phasenkontrast- und Auflichtfluoreszenz mit Photoaufsatz. Objektive: Je nach Vergrößerung (mit Öl-immersion) Apochromate, Neofluare, Achromate, PH 2, PH 3, bis maximal 100-fache Vergrößerung, Okular 12,5-fach, Optovar 1,25 (wenn nicht anders angegeben), Projektion 6,3-fach, Maximalvergrößerung bis 2600 -fach.

Filme: Agfa professional 50 S für Fluoreszenzaufnahmen; Agfa DIN 18 SW für Schwarz-weiß-Aufnahmen, Phasenkontrast- und Fluoreszenzbilder.

4. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende 2,7- und 9-mono-di- und tri-substituierte Derivate des Acridins dargestellt und physikalisch-chemisch und biologisch untersucht:

2-Aminoacridin (2-AA)

2,7-Diaminoacridin (2,7-DiAA)

2-Amino-7,9-dimethylacridin (2-A-7,9-DiMeA)

2-Amino-7-methoxy-9-methylacridin (2-A-7-Met-9-MeA)

2,7-Diamino-9-methylacridin (2,7-DiA-9-MeA)

Die notwendigen Synthesen wurden nach z.T. älteren Vorschriften nachvollzogen. Nichtpublizierte Synthesewege wurden neu erarbeitet. Die Substanzen wurden charakterisiert und mit Originalsubstanzen verglichen.

Mithilfe der Tieftemperaturspektroskopie (A,F,APF,FP) und quantenchemischer Rechnungen nach der PPP-Methode wurden Beiträge zur Klärung der Elektronenstruktur dieser Verbindungen geliefert. Insbesondere weisen die Fluoreszenz- und Fluoreszenzpolarisationsspektren der Derivate 2,7-DiAA und 2,7-DiA-9-MeA auf bemerkenswerte fluoreszenzoptische Eigenschaften dieser Verbindungen.

Bei Normaltemperatur wurden die Säure-Base-Gleichgewichte dieser Verbindungen untersucht. Es wurden

- a) die $1.pK_s$ -Werte, die von erheblicher biologischer Bedeutung sind, ermittelt und
- b) die Orte der Protonierung bei den verschiedenen Protonierungsstufen bestimmt und
- c) die unter den Definitionen Solvatochromie, Orthochromasie und Metachromasie zu beschreibenden Substanzeigenschaften in Lösungen bei diesen Verbindungen geprüft.

Lösungsspektren in Gegenwart der Chromotrope DNA und RNA zeigen Besonderheiten. Die 9-Methylacridinderivate 2-A-7,9-DiMeA, 2-A-7-Met-9-MeA und 2,7-DiA-9-MeA werden spektroskopisch beobachtbar in einer Weise pH-unabhängig an die Chromotrope gebunden, welche für die Derivate 2-AA und 2,7-DiAA nicht zutrifft. Auffällig sind hierbei die erheblich differierenden Befunde, welche einerseits mit 2,7-DiAA und andererseits mit 2,7-DiA-9-MeA erhoben werden müssen.

Es wurde eine Hypothese über den Reaktionsmechanismus dieser 9-Methylacridinderivate mit den Nukleinsäuren formuliert, die mit spektroskopischen und (nachfolgenden) fluoreszenz-mikroskopischen Argumenten gestützt werden kann.

Im biologischen Teil der Arbeit wurden mit phasen-
kontrast- und fluoreszenzmikroskopischen Methoden lebende
und fixierte Zellen und ausgewählte, fixierte Organpräparate
nach einer Fluoreszenzfärbung mit den genannten Acridin-
derivaten untersucht. Dabei zeigte es sich, daß die besondere
Stellung der hier geprüften 9-Methylacridinderivate
regelmäßig auf die spezifische Affinität dieser Verbindungen
zu den Nukleinsäuren zurückgeführt werden muß.

Folgende cytologische und histologische Befunde wurden erhoben:

- a) Vitale Zellkerne werden durch diese Fluorochrome in der
Farbe der Monokationen gefärbt. Parallel dazu können phasen-
optisch charakteristische Zellstrukturveränderung an Kern
und Cytoplasma beobachtet werden.
- b) Mit den Verbindungen 2-AA und 2,7-DiAA wird keine
Vitalfluorochromierung der Kerne erzielt. Es zeigen sich auch
keine mit den verhergenannten Zellstrukturveränderungen
vergleichbaren Beobachtungen.
- c) Zellkerne fixierter Zellen zeigen bei der Fluoreszenzfärbung
ebenfalls die Sonderstellung der 9-Methylacridinderivate.
Diese fluorochromieren den Zellkern pH-unabhängig in der
Farbe der Monokationen. Hingegen fluorochromieren 2-AA und
2,7-DiAA nukleäre, fixierte Substrate nur pH-abhängig
orthochromatisch.
- d) Gemeinsame Eigenschaft aller hier untersuchten Acridine
ist es, cytoplasmatische Areale, bevorzugt die Kernbucht, in
vitalen und fixierten Zellen pH-abhängig orthochromatisch
zu fluorochromieren.
- e) Da der Farbumschlag Base/Monokation rasch eintritt,
können diese Verbindungen im Bereich ihres ersten pK_s -Wertes
auch als intrazelluläre Fluoreszenzindikatoren
benutzt werden.

5. LITERATURVERZEICHNIS

1. A. Albert, The Acridines, Arnold Publ., London 1966
2. A.C. Allison, M.R. Young, Life Sci., 3,1407 (1964)
3. R.M. Acheson, Heterocyclic Compounds: Acridines,
J. Wiley, N.Y., Vol.9, 2nd.Ed. 1973
4. D.E. Atkinson, Ann.Rev.Biochem. 35,85 (1966)
5. K. Bauer, chem.Ber. 83,10 (1950)
6. D. Bergmann, Dissertation Universität Freiburg 1976
7. L.v. Bertalanffy, Krebsarzt 16,521 (1961),
Protoplasma 57,57 (1963)
8. J. Bergeron et al. J.Biochem.Biophys. 4,4 (1958)
9. R. Brdicka, Phys.Chemie, VEB Wiss, Berlin, 6.Aufl. 1967
10. C.R. Bradster, Chem.Rev. 38,494 (1946)
11. R.Q. Brewster, Org.Syn. 14,66 (1934)
12. M.T. Bogert et al. Coll.Czech.Chem.Comm. 2,383 (1930)
13. M. Born, J.R. Oppenheimer, Ann.Phys. 84,457 (1927)
14. W. Borsche, chem.Ber. 66,1315 (1933)
15. F. Bukatsch, H. Haitinger, Protoplasma 34,515 (1940)
16. H.C. Burck, Histologische Technik, Thieme, Stgt.,
3.Aufl. 1973
17. T. Caspersson et al. Exper.Cell.Res. 58,128,141 (1969)
60,315 (1970), Chromosoma 30,215 (1970)
18. J. Glauwaert et al., Z.Naturf. 823,24 (1958)
19. B. Cairns, W.O. Kermack, J.Chem.Soc. 1322 (1950)
20. D.P. Craig, L.N. Short, J.Chem.Soc. 419 (1945)
21. F. Dörr et al. angew.Chem. 72,207 (1960), 78,457 (1966)
Z.anal.Chem. 197,291 (1963)

22. M.J.S. Dewar, G. Gleicher J.A.C.S. 87,685 (1965),
91,786,796 (1969)
23. P. Ehrlich, Archiv mikr.Anat. Entw. 13,1885 (1876),
dt.med.Wochenschr. 12,49 (1886),
Enzyklopädie mikr.Techn. Berl.Wien,U.Schw. 1903
24. A. Frey- Wyssling, Sym.Soc.Exp.Biol. 6,320 (1952)
25. I. Fischer-Hjalmars, Adv.Quant.Chem. 2,25 (1965)
Arkiv f.Fysik 21,123 (1961), Act.Chem.Scand. 22,607 (1968)
26. L. Foucouneau, Bul.Chim.Soc.Fr. 4,58 (1937) /C.A. 31,3217
(1947)/
27. Th. Förster, Fluoreszenz org.Verb. Göttingen Van.Rup.1951
28. C. Gräbe, K. Jagodzinsky, Ann.Chem. 276,35 (1893)
29. G. Giemsa, DMW 36,550f., Zentr.Bl.Bakt. 91,343
30. M. Goepfert-Mayer, A.Sklar, J.Chem.Phys. 6,645 (1938)
31. I. Goldberg et al., Chem.Ber. 39,1691 (1906)
32. E.S. Gould, Mechanismus und Struktur, Verl.Chem.,
Weinheim, dt.Ausg.1971
33. N.E. Greenblatt, S. Sharpless, Exp.Parasit. 24,205,216
(1969)
34. N.S. Ham, K. Ruedenberg, J.Chem.Phys. 65,1,13 (1956)
35. H. Harms, Handbuch der Farbstoffe für die Mikroskopie,
Staufen 1957
36. E. Harbers, G. Domagk, Die Nukleinsäuren, Stgt. 1964
37. K. Jug, theor.chim.act. 14,91 (1966)
38. H. Ito, Int.J.Quant.Chem. 2,5 (1968)
39. D.O. Jordan, Nucleic Acids, Ac.Press, N.Y. Vol.I,447
(1954)
40. C.K. Ingold, Structure and Mechanism, N.Y. 1953
41. L. Ingram, H. Johansen, Arch.Biochem.Biophys. 132,205
(1969)

42. IUPAC-nomenclature Section 1,2, Butterw., London, S.58ff., 1966
43. F. Jourdan, Chem.Ber. 18,1444 (1885) /C.A. 48,987/
44. H.H. Jaffe, M. Orchin, Symmetry in Chemistry, dt. Übersetzung, Heidelberg 1973
45. M. Klessinger, theor.chim.act. 5,236,251 (1966), Fortschr.Chem.Forsch. 9,360 (1968)
46. G. Klopman, Chem.Phys.Letters 1,200 (1967)
47. Kortüm, Lehrbuch der Elektrochemie, Verl.Chemie, Weinheim 1962
48. A. Korolkovacs, mol.Pharmakologie, Stgt. Thieme 1974
49. H. Kramer et al., J.Histochem.Cytochem. 3, 227 (1955)
50. G. Kuschinsky, Pharmakologie, Thieme, Stgt., 6.Aufl. 1974
51. I.S. Lerman, J.Mol.Biol. 3,18 (1961) /Proc.Nat.Ac.Sc. 49,94 (1963)
52. R. Lippert, Z.Naturforsch. 10a,541 (1955), Z.Elektrochemie 58,718 (1964), Die opt.Anregung, Farbensymp. Weinheim 1966
53. W. Liptay, angew.Chemie 81,195 (1969)
54. P.O. Löwdin, Adv.Quant.Phys. II,207 (1959)
55. S. Logar, J. Percavec, Microchim.act.712 (1964)
56. C.H. Lin et al. J.chin.chem.Soc. (Taiwan) 18,155 (1971)
57. N. Mataga, Bull.chem.Soc.Jap. 36, 1607 (1963), Z.Phys.Chem. (NF) 13,140 (1957)
58. J.N. Murrell, Elektronenspektren org.Verbindunden, Mannheim, B.I. 1967
59. F. Morthland, P.de Bruijn, Exp.Cell.Res. 7,201 (1954)

60. W.v. Möllendorf, Arch. mikr.Anat. 90,463 (1918),
Ergebn.Physiol.18,141 (1920),
Handb.biol.Arb.meth.v.Abderhalden 5,2 (1928),
Z.Zellforsch. 23,746 (1936)
61. R.S. Mulliken, Repr.Progr.in Phys. 8,231 (1941)
62. K.Nishimoto,N.Mataga,Z.phys.Chem.(NF) 12,335 (1957),
21,568 (1961)
63. K.Nishimoto,L.Forster, theor.chim. act. 3,407 (1965),
J.Phys.Chem. 71,409 (1966)
64. F.Nissl, zitiert nach C.H.Burck(16),
Neurol.Zentralblatt 19,21 (1894)
65. E.Nierenstein,Pflüg.Archiv Ges. Physiol. 179,233 (1920)
66. L.Onsager, J.A.C.S. 58, 1486 (1936)
67. Organikum,Autorenkollektiv,7.Aufl.Berlin 1967
68. H.W.Preuss,quantentheoretische Chemie I,II,III,
Mannheim,B.I. 1963
69. L.Pauling,E.B.Wilson, Introduction to quant.Mechanics,
N.Y.1935,Neudruck 1965
70. R.G.Parr,R.Pariser, J.Chem.Phys. 21,466,767 (1953),
24, 250 (1956)
71. J.A.Pople, Trans.Farad. Soc. 49, 1375 (1953)
72. F.Perrin, Ann.d.Physique 12, 169 (1929)
73. A.R.Peacock et al., Trans.Farad.Soc. 52,261 (1965),
Biopolymers 6,1225 (1968), 10,1853 (1971)
74. M.Perutz,Proteins and Nucleic Acids,London,
Amsterdam,Els.1964
75. D.Phillips, act. cryst. Lond., 9,237 (1956)
76. P.Pischinger, Z.Zellforsch 3, 169 (1926)

77. J.R.Platt, J.chem.Phys. 17, 484 (1949)
78. B.Pullman, Quant.Biochem.,N.Y. Int.Sci.Pub. 1963,
Mol.Pharm. 7,397 (1971)
79. P.P.Pheophilov, the physikal basis of polarized Emission
Consul.Bureau N.Y. 1961
80. D.Radulescu,G.Ostrogovic, Chem.Ber. 64, 2233 (1931)
81. L.Rabinowitch,L.Epstein, J.A.C.S. 63,69 (1941)
82. G.H.Rettie et al. J.Soc.Dyers and Col. 80, 629 (1964)
83. P.W.Reynolds,/C.A. 43,6762(1969)/ ICI Brit.Pat.621749
84. M.Richter,Lexikon der Kohlenwasserstoffverbindungen,
Berlin 1900
85. R.Rigler, act.phys. scand. 67,Suppl.267,1 (1966)
86. J.C.C. Roothaan,G.G.Hall,Rev.mod.Phys. 23,69 (1951)
Proc.Roy.Soc.Lon. A 205,541 (1951)
87. W.Ritz, J.reine u. angew. Math. 135,1 (1909)
88. M.J.Sascha, S.R.Patel, J.ind.chem.Soc. 34,821 (1957)
89. G.Schwarz et al.,Eur. J.Biochem. 12,445,461 (1970)
90. G.Scatchard, Ann.N.Y.Ac.Sci. 51,660 (1949)
91. W.Schmidt, Z.Zellforsch. 58, 573 (1962)
92. H.Schlegel,allgem.Mikrobiologie,Thieme,Stgt.,
3.Aufl.1974
93. W.Schnedl, Archiv Gen. 42,65 (1973),
Wiener klin.Wochenschr. 84,389 (1972)
94. M.Schubert, J.Histochem.Cytochem. 4, 159 (1956)
95. N.Schümmelfeder et al., Z.Zellforsch. 44, 327 (1956),
Naturwiss. 35,346 (1948)
96. M.Schmidt, anorg.Chemie,Bd. 1,B.I.,Mannheim 1967

97. W.Schröter, Methoden d.org.Exp. in Houben-Weyl Bd.11, 360-512 (1970)
98. W.Seiffert et al., Histochemie 23, 220 (1970)
99. W.Sharp, M.M.Sutherland, J.chem.Soc. 344, (1945)
100. P.Sitte et al., Grundlagen.d.Cytologie, Stgt., Fischer, 1973
101. S.M.Sherlin, G.I.Bras, Ann.Chem. 516, 218 (1935)
102. R.Stelzner, Literaturregister org.Chemie, Braunschweig, 3, 59 (1921)
103. G.Stahl, Dünnschichtchromatographie, Heidelbg. 1967
104. G.Strugger, Jenaische Z.Naturforsch. 73, 97 (1941), Fluoreszenzmikroskopie u.Mikrobiol., Hannover 1949
105. P.Skancke et al., act.chem.scand. 18, 1671 (1964), 21, 233 (1967)
106. J.C.Slater, Phys.Rev. 38, 1109 (1931)
107. K.Töpfer, Histochemie 20, 64 (1969)
108. P.O.D.Tso, Nucleic Acids, N.Y., Ac.Press 1974
109. K.B.Taylor, Stain.Techn. 36, 73 (1961)
110. F.Ullmann, chem.Ber. 36, 2382 (1903), Friedländers Ber. 8, 161 (1908)
111. P.Unna, Z.Mikroskop. 8, 475 (1891)
112. H.G.Unger, Diplomarbeit Chemie, Göttingen, 1971
113. S.I.Wawilov, Z.Physik 55, 690 (1929), 58, 4471 (1929)
114. R.Wattiaux, Chr.de Duve, Ann.Rev.Physiol. 28, 435 (1966)
115. B.Weisblum, P.de Haseth, Proc.Nat.Ac.Sci. 69, 3, 629 (1972)
116. H.H.Wellhöner, allgem.Pharm.u. Toxik., Heidelbg.Spr. 1975
117. S.Witte, Verh. dt. Ges. inn.Med. 74, 617 (1968)
118. D.Wittekind, Mikroskopie 14, 9 (1959), Z.wiss.Mikrosk. 63, 4 (1957)

119. D.Wittekind, J.Kunze, Hämatol.Bluttrr.München 8, 146 (1969),
anatom.Anzeiger 125, 241 (1969)
120. D.Wittekind, J.Staubesand, Cytobiol.2, 275 (1970)
121. D.Wittekind, V.Kretschmer, Z.Zellforsch. 126, 518 (1972)
122. D.Wittekind in Fluoresz.Tech. in Cell Biology, Seattle,
1972, by A.Thaer, M.Sernetz, Frankfurt 1973
123. D.Wittekind, J.Kunze, anatom.Anzeiger 126, 511 (1970)
124. D.Wittekind, persönl.Mitteilung
125. K.E.Wohlfarth-Bottermann, 102.Verhandl.dt. Ges.Nat.forsch.
u.Ärzte 1972, Springer, Berlin, S.77 ff.
126. R.Zahradnik, J.chem.Phys. 72, 3975 (1968),
Tetrahedron 26, 1303 (1970)
127. V.Zanker, Z.phys.Chem. 199, 225 (1952), 200, 250 (1952)
128. V.Zanker, G.Scheibe, Histochemie 3, 122 (1962),
angew.Physik 18, 398 (1964)
129. V.Zanker, A.Wittwer, Z.phys.Chem.(NF) 22, 417 (1959),
24, 314 (1960)
130. V.Zanker, Histochemie Suppl. Bd.13, 281 (1973)
131. I.Zimmermann, Dissertation Freiburg 1975
132. W.Romeis, mikroskop.Technik, Verl.Oldbg. München 1968
133. L.Thorp, J.A.C.S. 37, 1258 (1915)
134. H.Zollinger, P.Rys, Leitf.Farbstoffchem.Weinheim 1970

6. LEBENS LAUF

Am 28.12.1947 wurde ich als zweiter Sohn des Arztes Dr.med.Gotthold Unger und seiner Ehefrau Paula geb.Wagner in Marbach/N Kreis Ludwigsburg geboren.

Nach Übersiedelung nach Öhringen, heute Hohenlohekreis, 1950 besuchte ich dort die Grundschule von 1954 bis 1958. Das örtliche Hohenlohe-Gymnasium besuchte ich von 1958 bis 1966.

Am 13. Okt.1966 legte ich dort die Reifeprüfung ab.

Ab dem 25.10.1966 habe ich Chemie studiert:

Vom 25.10.1966 - 30.9.1969 an der TH(Universität) Stuttgart, dort legte ich das Vorexamen Chemie am 20.5.1969 ab.

Vom 6.10.1969 - 30.4.1970 an der T.H.Clausthal-Zellerfeld/Harz, vom 6.5.1970 - 23.9.1971 an der Universität Göttingen, dort legte ich am 14.6.1971 die Diplomchemiker-Hauptprüfung mit der Gesamtnote "gut" ab, Diplomarbeit bei Prof.Klessinger, jetzt Münster, Thema: Hypsochrome Verschiebung des längstwelligen Absorptionsmaximums ebener ungesättigter Kohlenwasserstoffe.

In diesem Jahr erhielt ich vom Stipendienfonds der chemischen Industrie ein Examenstipendium für das erfolgreiche Examen in entsprechend kurzer Zeit (10 Semester).

Während der Zeit meiner Diplomarbeit, für die ich vorübergehend als Gast am Rechenzentrum der Universität Freiburg gearbeitet habe, habe ich die Arbeitsgruppen der Professoren Dr.rer.nat. H.Zimmermann und Dr.med.D.Wittekind kennengelernt. Um nun eine Doktorarbeit unter Leitung dieser Hochschullehrer durchführen zu können, studierte ich ab 2.11.1971 bis 30.8.1971 Chemie und Medizin an der Universität zu Freiburg.

Während dieser Zeit war ich vom 15.11.1971 -30.9.1973 wissenschaftlicher Angestellter am Anatomischen Institut der medizinischen Fakultät der Universität Freiburg, zugeordnet dem Lehrstuhl II, Prof. Dr. med. D. Wittekind. Nach einer schweren Erkrankung im Frühjahr 1973 unterbrach ich meine Arbeiten bis Frühjahr 1974.

Am 22.2.1974 legt ich die ärztliche Vorprüfung, Physikum nach BO, vor dem Prüfungsausschuß für die ärztliche Vorprüfung der med. Fakultät der Universität Freiburg ab.

Vom 1.10.1974 - 30.9.1976 war ich Stipendiat nach dem GFG an der Fakultät für Chemie und Pharmazie, zugeordnet als Gast dem Institut für physikalische Chemie, Lehrstuhl I, Prof. Dr. H. Zimmerman.

Am 11. Juli 1977 legt ich vor dem Prüfungsamt für die ärztliche Prüfung in Freiburg das medizinische Staatsexamen nach der BO mit der Gesamtnote "sehr gut" ab.

Am 4.10.1975 heiratete ich die österreichische Staatsbürgerin Margarete Dvorak, Dr. phil (klassische Philologie).

Am 26.3.1976 ist unser erster Sohn Christian Wolfgang Helmut geboren.

Zur Zeit bin ich Medizinalassistent an der medizinischen Klinik des Klinikums der Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg.

Druck: H. Speh 7110 Öhringen Tel. 07941/7666